



**HAL**  
open science

# Susceptibilité individuelle à la néphrotoxicité du Tacrolimus après transplantation rénale

François Glowacki

► **To cite this version:**

François Glowacki. Susceptibilité individuelle à la néphrotoxicité du Tacrolimus après transplantation rénale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S003 . tel-00740500

**HAL Id: tel-00740500**

**<https://theses.hal.science/tel-00740500v1>**

Submitted on 10 Oct 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Ecole Doctorale Biologie Santé  
Université de Lille-Nord de France

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur de  
l'Université de Lille

Par :

François-Xavier GLOWACKI.

SUSCEPTIBILITE INDIVIDUELLE A LA NEPHROTOXICITE DU TACROLIMUS APRES TRANSPLANTATION RENALE.
--

Présentée et soutenue publiquement le 27 Mars 2012 devant :

Mr le Pr Christian Noël : Président.

Mr le Pr Vincent Haufroid : Rapporteur.

Mr le Pr Alexandre Hertig : Rapporteur.

Mr le Pr Franck Broly : Directeur de thèse.

Mr le Pr Yannick Le Meur.

Mme le Dr Christelle Cauffiez.

Nom : Glowacki

Prénom : Francois-Xavier.

Titre de la thèse : Susceptibilité individuelle à la néphrotoxicité du Tacrolimus après transplantation rénale.

Title : Individual susceptibility to Tacrolimus nephrotoxicity after renal transplantation.

Thèse d'Université N°:

Mots Clefs: Transplantation, Néphrotoxicité, Tacrolimus, CYP3A5, ABCB1, Fibrose, Cavéoline-1.

Résumé : Le rein est particulièrement exposé à de nombreux composés chimiques dont des médicaments potentiellement néphrotoxiques. Parmi-eux, le Tacrolimus (Tac), un anti-calcineurine largement utilisé en transplantation rénale, est associé à l'apparition plus ou moins rapide de lésions histologiques de toxicité conduisant à une fibrose interstitielle rénale et, à terme, à une perte de fonction du greffon. Des systèmes enzymatiques et protéiques impliqués dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques, ainsi que des protéines aux propriétés anti-fibrosantes, telles que la cavéoline-1 (CAV-1), lui permettent de se défendre contre ce type d'agressions locales prolongées. Ces différents systèmes de défense étant hautement polymorphes, le principal objectif de notre travail était de déterminer l'impact de certains polymorphismes génétiques sur la susceptibilité individuelle à la néphrotoxicité du Tac.

Dans un premier temps, l'impact sur les paramètres pharmacocinétiques du Tac et le devenir du greffon de deux polymorphismes génétiques affectant les gènes codant pour les CYP3A5 et ABCB1, deux protéines participant au transport et au métabolisme du Tac, a été évalué dans une cohorte de 209 patients transplantés rénaux. Le génotypage a été réalisé à la fois sur l'ADN des receveurs et des donneurs. Les patients ont été suivis jusqu'à 2 ans après transplantation rénale. Cette étude a confirmé que les receveurs sous Tac (Prograf®) porteurs d'au moins un allèle CYP3A5\*1 nécessitent, quelque soit le moment de la greffe, des posologies de Tac plus élevées. Malgré ces doses, leur taux résiduel de Tac (C0) reste plus faible. En ce qui concerne le devenir du greffon, malgré son impact sur la pharmacocinétique du Tac, le polymorphisme génétique du CYP3A5 du receveur, ou du donneur, n'est statistiquement pas associé à la survenue de rejet, de retard de fonctionnement de greffon, ou n'a d'impact direct sur la fonction rénale et la survie du greffon. La mutation 3435C>T affectant le gène ABCB1 du donneur ou du receveur n'influence ni les paramètres pharmacocinétiques, ni le devenir clinique du greffon.

Cependant, le Tac est désormais disponible sous une forme à libération prolongée (Advagraf®), permettant une prise unique journalière. Nous souhaitons vérifier l'influence de l'allèle CYP3A5\*1 dans cette nouvelle présentation. Des pharmacocinétiques sur 24h ont été réalisées chez 32 patients (17 receveurs CYP3A5\*1/- et 15 receveurs CYP3A5\*3/\*3) avant puis quinze jours après conversion Prograf®/Advagraf®. Sous Advagraf, l'influence de l'allèle CYP3A5\*1 sur la biodisponibilité du Tac est globalement la même que sous Prograf. Néanmoins, après conversion, l'exposition au Tac diminue de manière significative chez les receveurs CYP3A5\*1.

De manière plus fondamentale, afin d'analyser les capacités de défense du parenchyme rénal sain contre les xénobiotiques, nous avons mesuré l'expression de 380 gènes (par PCR en temps réel) impliqués dans le métabolisme et la prise en charge des xénobiotiques dans des échantillons de tissu rénal sain (n=8). Nous confirmons que le rein possède un arsenal de défense important et complet, et que le niveau d'expression de ces 380 gènes est globalement assez homogène entre les individus, excepté pour quelques gènes dont GSST1.

Enfin, l'influence d'un polymorphisme génétique, rs4730751, affectant le gène CAV1 (codant la cavéoline-1, une protéine inhibitrice de la fibrose tissulaire) sur la survie du greffon rénal a récemment été rapportée. Nous avons confirmé dans une cohorte de 475 transplantés rénaux que les patients porteurs de ce polymorphisme génétique à l'état homozygote (ADN du greffon rénal) ont une altération de la fonction rénale significativement plus rapide. Ainsi, par ce polymorphisme de CAV1, il est probable qu'indépendamment de leur capacité à métaboliser le Tac, certains patients puissent présenter plus facilement que d'autres des lésions de fibrose par toxicité chronique du Tac.

Composition du Jury :

Mr le Pr Christian Noël : Président.

Mr le Pr Vincent Haufroid : Rapporteur.

Mr le Pr Alexandre Hertig : Rapporteur.

Mr le Pr Franck Broly : Directeur de thèse.

Mr le Pr Yannick Le Meur.

Mme le Dr Christelle Cauffiez.

Adresse de l'auteur : 4 rue du Colonel Driant, 59136 WAVRIN

## Remerciements.

Aux Professeurs Vincent Haufroid, Alexandre Hertig et Yannick Le Meur d'avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail et d'en faire le rapport.

Au Professeur Christian Noël, d'avoir accepté de présider ce Jury. Merci pour la confiance dont vous me témoignez, ainsi que pour votre accompagnement et vos encouragements au fur et à mesure de mes différents travaux.

Au Professeur Franck Broly de m'avoir ouvert les portes de son Equipe d'Accueil, de me faire participer à l'élaboration du projet de l'équipe, et d'avoir permis le développement d'une thématique de recherche axée sur le rein.

Au Docteur Christelle Cauffiez, pour son enthousiasme à développer des projets, sa disponibilité, son sens de la pédagogie, sa rigueur scientifique et son intérêt sans cesse croissant pour le « monde néphrologique ».

A tous mes collègues Néphrologues du Service de Néphrologie du CHRU de Lille : merci pour votre soutien, pour votre aide et pour le temps que vous avez « directement ou indirectement » consacré à ces travaux.

A Cynthia Van der Hauwaert, Grégoire Savary et Julie Bloch pour leur enthousiasme communicatif.

Aux Docteurs Delphine Allorge, Jean-Marc Lo-Guidice pour la qualité de nos échanges et pour leurs conseils scientifiques, ainsi qu'à tous les membres de l'Equipe d'Accueil pour leur aide.

Aux Docteurs Sébastien Aubert, Viviane Gnemmi, Mickael Perrais et Nicolas Pottier pour les collaborations déjà réalisées et surtout pour celles à venir.

Au Docteur David Buob pour l'ensemble de ses « contributions » anatomopathologiques.

Au Docteur Lidia Ghisdal et aux Professeurs Marc et Daniel Abramowicz pour leur collaboration, leurs conseils et leur aide.

Au Docteur Françoise Dufossé, au Professeur Myriam Labalette et à l'ensemble des techniciens du laboratoire d'Immunologie de m'avoir donné accès aux collections biologiques qui sont à l'origine de ce travail.

Enfin, une pensée toute particulière à mon ami Philippe Mestdagh et à son combat actuel.

## Communications ayant fait suite aux travaux présentés.

### - Communication écrites.

Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provôt F, Hazzan M, Noël C, Broly F, Cauffiez C. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26(9): 3046-50.

Glowacki F, Lionet A, Hammelin JP, Labalette M, Provôt F, Hazzan M, Broly F, Noël C, Cauffiez C. Influence of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) genetic polymorphism on the pharmacokinetics of the prolonged-release, once-daily formulation of tacrolimus in stable renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2011; 50(7): 451-9.

### - Communications orales.

Glowacki F, Gnemmi V, Savary G, Lionet A, Buob D, Van Der Hauwaert C, Hazzan M, Broly F, Noël C, Cauffiez C. Impact du polymorphisme du gène de la Cavéoline-1 sur la fonction du greffon après transplantation rénale. 13e Réunion commune Société Francophone de Dialyse / Société de Néphrologie, Bordeaux, 4-7 octobre 2011.

### - Communications affichées.

Cauffiez C, Glowacki F, Lionet A, Provôt F, Hazzan M, Noël C, Allorge D, Broly F. Influence of CYP3A5 Polymorphism in Donor and Recipient on Tacrolimus Pharmacokinetics and Clinical Outcome after Renal Transplantation. 11<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, 3-8 octobre 2009, Montréal, Canada.

Glowacki F, Cauffiez C, Lionet A, Buob D, Provôt F, Hazzan M, Broly F, Noel C. Influence du polymorphisme génétique des CYP3A5, ABCB1 et PXR sur la pharmacocinétique du tacrolimus et le devenir du greffon rénal. 11e Réunion commune Société Francophone de Dialyse / Société de Néphrologie, Toulouse, 29 septembre-2 octobre 2009.

Cauffiez C, Glowacki F, Lionet A, Provot F, Hazzan M, Noel C, Broly F. Influence of CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms in Donor and Recipient on Tacrolimus Pharmacokinetics and Clinical Outcome after Renal Transplantation. 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 30 août – 2 septembre 2009, Paris, France.

# Sommaire.

<b>Partie 1 : Revue générale :</b> .....	p 9
1/ <u>Prise en charge des xénobiotiques par le tissu rénal</u> :	p 10
1-1/ Biotransformation et transport des xénobiotiques :	p 10
1-2/ Variabilité inter individuelle des capacités de prise en charge cellulaire des xénobiotiques :	p 13
1-2-1/ Facteurs environnementaux :	p 13
1-2-2/ Polymorphismes génétiques :	p 14
1-2-3/ Facteurs épigénétiques :	p 15
2/ <u>La néphrotoxicité induite par le Tac : un modèle clinique de néphrotoxicité chronique</u> :	p 18
2-1/ Données générales sur le Tacrolimus :	p 18
2-2/ Mode d'action des inhibiteurs de la calcineurine :	p 19
2-3/ Protéines impliquées dans la prise en charge du Tac :	p 18
2-3-1/ Données générales sur la pharmacocinétique du Tac :	p 20
2-3-2/ Protéines impliquées dans la prise en charge cellulaire du Tac :	p 21
2-3-3/ Polymorphismes génétiques affectant les <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> et <i>ABCB1</i> :	p 24
2-4/ Néphrotoxicité du Tac :	p 27
2-4-1/ Néphrotoxicité aiguë des anticalcineurines :	p 28
2-4-2/ Néphrotoxicité chronique des anticalcineurines :	p 30

3/ <u>Déterminants de la néphrotoxicité induite par le Tac</u> : .....	p 34
3-1/ Facteurs systémiques :... ..	p 34
3-1-1/ Paramètres cinétiques et niveaux d'exposition systémique (C0, AUC) au Tac :.....	p 34
3-1-2/ Impact du polymorphisme génétique du receveur et exposition aux ACN : .....	p 36
3-1-2-1/ Impact des polymorphismes génétiques de <i>CYP3A5</i> :.....	p 36
3-1-2-2/ Impact des polymorphismes génétiques de <i>CYP3A4</i> : .....	p 39
3-1-2-3/ Impact des polymorphismes <i>ABCB1</i> 3435C>T, 1236C>T et 2677G>T/A :.....	p 40
3-1-3/ Déterminants non génétiques de l'exposition au Tacrolimus :.....	p 41
3-2/ Exposition des cellules rénales au Tacrolimus :.....	p 42
3-2-1/ Expression tissulaire rénale de la Pg-P :.....	p 42
3-2-1-1/ Expression tissulaire rénale de Pg-P et toxicité des ACN :.p	42
3-2-1-2/ Effets des polymorphismes génétique de <i>ABCB1</i> portés par le donneur :.....	p 43
3-2-1-3/ Effets de l'environnement sur l'expression tissulaire rénale de la Pg-P :.....	p 45
3-2-2/ Expression rénale du <i>CYP3A5</i> :.....	p 45
3-3/ Déterminants de la vulnérabilité aux phénomènes de fibrose :.....	p 46
3-3-1/ Polymorphisme génétique de <i>APOL1</i> :.....	p 46

3-3-2/ Polymorphisme génétique de <i>CAV1</i> :.....	p 47
3-3-2-1/ Cavéoles et cavéoline-1 :.....	p 47
3-3-2-2/ Implication de <i>CAV-1</i> dans différentes pathologies fibrosantes :.....	p 49
3-3-2-3/ Polymorphisme génétique de <i>CAV1</i> , fibrose et perte du greffon rénal :.....	p 51
<b>Objectif global du projet de recherche</b> : .....	p 53
<b>Partie 2 : Travaux</b> : .....	p 58
1/ Impact du polymorphisme génétique du cytochrome P450 3A5 sur la pharmacocinétique du Tac en monoprise (Advagraf®) en transplantation rénale : .....	p 59
2/ Impact des polymorphismes génétiques <i>CYP3A5</i> (6986 A>G) et <i>ABCB1</i> (3534 C>T) du donneur et du receveur sur l'exposition au Tac, sa néphrotoxicité, et le pronostic fonctionnel du greffon rénal :.....	p 70
3/ Variabilité interindividuelle des capacités rénales à prendre en charge les xénobiotiques : impact potentiel sur les phénomènes de néphrotoxicité : .....	p 83
4/ Impact du polymorphisme génétique de <i>CAV1</i> du donneur sur les phénomènes de fibrose interstitielle et sur la perte de fonction du greffon rénal : .....	p 101
<b>Perspectives</b> : .....	p 113
<b>Bibliographie</b> : .....	p 119



## Abréviations.

- ABC : ATP Binding Cassette transporter.
- ACN : Anticalcineurine.
- AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.
- AUC : Aire sous la courbe.
- C0 : Concentration sanguine résiduelle d'un médicament avant une nouvelle prise.
- CNV : Copy Number Variation.
- CsA : Cyclosporine A.
- CYP : Cytochrome P450.
- DFG : Débit de Filtration Glomérulaire.
- EMTX : Enzyme du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques.
- FI/AT : Fibrose Interstitielle/Atrophie Tubulaire.
- GWAS: Genome Wide Association Study.
- MAT : MicroAngiopathie Thrombotique.
- MDRD : Modification of Diet in Renal Disease.
- miARN : microARN.
- NR : Nuclear Receptor.
- Pg-P : glycoprotéine-P.
- RFG : Retard de Fonctionnement du Greffon.
- SLC : Solute Carrier.
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism.
- SRA : Système Rénine Angiotensine aldostérone.
- Tac : Tacrolimus.
- TEM : Transition Epithélio-Mesenchymateuse.
- TGF $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$ .

## **Partie 1 : Revue générale**

Prise en charge des xénobiotiques par le rein et déterminants  
de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus

# 1/ Prise en charge des xénobiotiques par le tissu rénal.

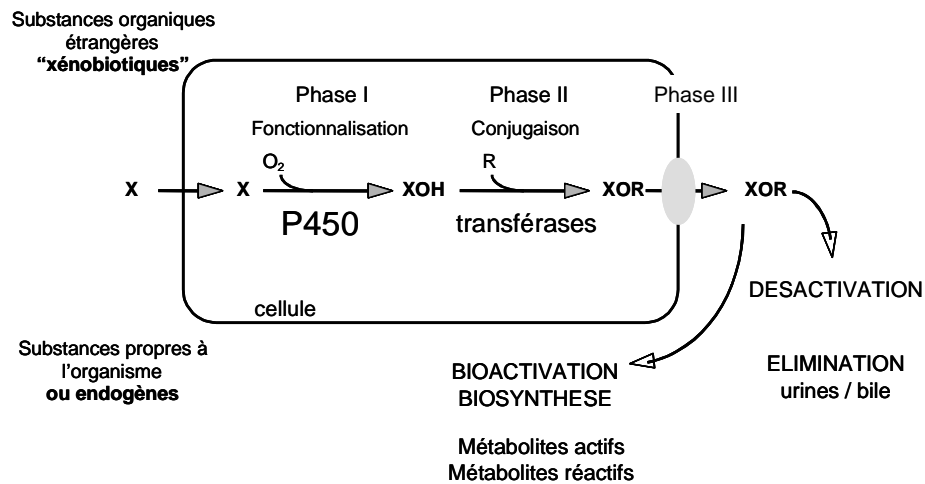
## 1-1/ Biotransformation et transport des xénobiotiques.

De par leur environnement, les organismes vivants sont constamment exposés directement ou indirectement à un grand nombre de composés exogènes de petit poids moléculaire, rassemblés sous le terme de xénobiotiques. Parmi ces molécules, on compte des composés naturels ou de synthèse, tels que des médicaments, des composés industriels, des polluants atmosphériques, des pesticides, des toxines naturelles...

Des systèmes enzymatiques puissants, capables d'effectuer un large spectre de réactions chimiques, se sont développés au cours de l'évolution afin de réaliser la détoxification d'une partie de ces composés. En effet, ces molécules généralement hydrophobes ont tendance à s'accumuler dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires et peuvent entraîner la mort cellulaire (Parkinson *et al.*, 1996). Les processus de détoxification sont assurés par des systèmes dits de « biotransformation » présents dans la plupart des organismes vivants. Ce processus se déroule généralement en trois phases, mettant en jeu différentes enzymes de biotransformation, regroupées sous le terme d'Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques (EMTX) : les enzymes de phase I (dites de fonctionnalisation) et de phase II (dites de conjugaison), ainsi que des protéines de phase III, représentées par des transporteurs. De plus, des facteurs nucléaires coordonnent le métabolisme et le transport de ces composés (**Figure 1**).

Les réactions de phase I permettent l'introduction d'une fonction chimique supplémentaire, et produisent des métabolites de polarité supérieure, c'est-à-dire plus hydrophiles, qui peuvent soit être directement éliminés dans la bile ou l'urine, soit être transformés par des enzymes de phase II. Ces réactions sont des oxydations, des réductions ou des hydrolyses de la molécule mère (Rendic *et al.*, 2002). Elles sont principalement catalysées par les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (P450 ou CYP), qui réalisent à eux seuls environ 90 % de ces réactions (Oestreicher *et al.*, 1999).

Chez l'homme, 17 familles de cytochromes P450, comportant 57 gènes, répartis sur 15 chromosomes, et autant de pseudogènes ont été identifiés.



**Figure 1 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques.** Les xénobiotiques (X) sont des molécules hydrophobes, qui pénètrent facilement dans la cellule par diffusion. Ils peuvent être métabolisés par fonctionnalisation puis / ou par conjugaison, en produits plus hydrophiles (XOH et XOR) ou expulsés par des protéines comme la P-glycoprotéine (P-gp). Leur élimination est directe ou effectuée par l'intermédiaire de protéines dites de Phase III (d'après Beaune *et al.*, 2000).

Les réactions de phase II, dites de conjugaison, permettent généralement le transfert d'un radical hydrophile endogène (glutathion, acétate, acide glucuronique, groupements méthyl, glycine, sulfate ou acétate) pour produire des composés plus hydrophiles pouvant être excrétés par voies rénale et/ou biliaire (Grant, 1991). Certaines molécules sont directement conjuguées, sans étape de fonctionnalisation préalable.

Les protéines de phase III assurent essentiellement le transport actif des xénobiotiques hydrophiles et des conjugués de phase II hors de la cellule (Gerloff *et al.*, 2004). Ces transporteurs membranaires peuvent se situer sur la face apicale ou basolatérale des cellules, et ainsi éliminer les composés conjugués dans le sang, la lumière intestinale, la bile ou l'urine. Les transporteurs des xénobiotiques, représentés par les superfamilles des

SLC (Solute Carrier) et des ABC (ATP-binding cassette ou ABC), appartiennent à une classe de protéines extrêmement nombreuses dont le rôle est de réguler l'entrée ou la sortie de substances endogènes et/ou exogènes au travers de la membrane plasmique *via* différents modes de transport. La superfamille des SLC compte actuellement plus de 350 membres (362 gènes) regroupés en 43 sous-familles (de SLC1 à SLC43). Tous les membres de cette superfamille nécessitent pour fonctionner un apport d'énergie qui provient d'un gradient électrochimique de solutés inorganiques ou organiques. Les transporteurs de la famille des ABC, quant à eux, sont regroupés en 7 sous-familles (ABCA à ABCG) qui comprennent plus d'une soixantaine de membres (62 gènes). Ces transporteurs nécessitent un apport d'énergie fourni par l'hydrolyse de l'ATP. Actuellement, 89 gènes de transporteurs clairement impliqués dans le transport de xénobiotiques ont déjà été identifiés chez l'homme, tous membres des superfamilles SLC ou ABC (Kim *et al.*, 2002, Sweet *et al.*, 2005, Deeley *et al.*, 2006). Parmi eux, la glycoprotéine-P (Pg-P) ou ABCB1, codée par le gène *ABCB1* (*MRP1* dans l'ancienne nomenclature), est le transporteur membranaire le mieux connu jusqu'ici et semblerait être le plus important pour la disponibilité des xénobiotiques chez l'être humain (Schwab *et al.*, 2003). La Pg-P possède un large spectre de substrats qui ont des structures très diversifiées, le plus souvent de nature hydrophobe et amphotère. Par ailleurs, les transporteurs suscitent un intérêt croissant ; en effet, en diminuant la quantité de médicament présente dans les cellules, ils peuvent être responsables de résistances multiples (Silverman *et al.*, 1997).

Les réactions métaboliques aboutissent la plupart du temps à une désactivation du xénobiotique mais peuvent parfois conduire à la formation d'un métabolite plus actif, voire plus toxique, que le composé initial. Dans certains cas, le métabolite formé, très réactif vis à vis des macromolécules cellulaires, en particulier de l'ADN, peut entraîner la formation d'adduits qui, s'ils ne sont pas réparés, provoquent des mutations et peuvent, de ce fait, initier des processus de cancérogenèse (Pelkonen *et al.*, 1997).

Rôles des récepteurs nucléaires ou « xénosensors »: L'équilibre entre ces différentes phases de détoxification qui dépend, au moins partiellement du profil d'expression des enzymes et transporteurs exprimés dans un tissu, joue un rôle majeur dans la stratégie globale de défense des organismes face aux agressions toxiques des xénobiotiques et est essentiellement assuré par un groupe de récepteurs nucléaires (NR), comme l'AhR (aryl hydrocarbon receptor), le PXR (pregnane X receptor, NR1I2) ou le CAR (constitutive androstane receptor, NR1I3). Le rôle de ces protéines NR, souvent désignés par le terme « xénosensors », est de détecter les xénobiotiques dans la cellule et de coordonner l'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques et les transporteurs les plus appropriés afin d'inactiver et / ou d'éliminer ces composés (Rushmore *et al.*, 2002). De cette manière, ils sont essentiels pour une prise en charge efficace des xénobiotiques entrant dans les cellules et doivent être considérés comme des éléments clés du système de défense de l'organisme face à son environnement chimique.

## **1-2/ Variabilité inter individuelle des capacités de prise en charge cellulaire des xénobiotiques.**

De nombreux facteurs (physiologiques, environnementaux ou génétiques) peuvent influencer de manière significative l'activité des protéines prenant en charge les xénobiotiques, et être ainsi responsables de différences interindividuelles de réponse à un composé chimique. Cette variabilité constitue un facteur de prédisposition potentiel à des affections d'origine environnementales (Thier *et al.*, 2002).

### **1-2-1/ Facteurs environnementaux.**

De nombreuses substances (alimentation, médicaments) peuvent influencer l'expression des EMTX en induisant leur expression ou en inhibant leur activité.

Parmi les **aliments**, le jus de pamplemousse est un inhibiteur connu du CYP3A4 (et du transporteur SLCO2B1, anciennement dénommé OATP2B1). Les autres agrumes n'ont

cependant pas d'effet connu (Tapaninen T *et al.*, 2010). Cette inhibition est très rapide après l'ingestion du jus de pamplemousse.

Parmi les **substances naturelles**, le millepertuis ou herbe de Saint Jean (utilisé en automédication comme phytothérapie antidépressive), est un inducteur du CYP3A4 et de la Pg-P (Ernst *et al.*, 2002).

De nombreux **médicaments** inhibent l'activité où, au contraire induisent l'expression de nombreux CYP (**Tableau 1**). Ces modifications d'activité peuvent être responsables d'interactions médicamenteuses.

**Tableau 1 : Principaux substrats, inducteurs et inhibiteurs des P450** majoritairement impliqué dans le métabolisme des médicaments (Livret des interactions médicamenteuses, [www.vidal.fr](http://www.vidal.fr))

CYP	PRINCIPES ACTIFS	INHIBITEURS	INDUCTEURS
1A2	- clozapine - tacrine - théophylline	- énoxacine - fluvoxamine	
2C9, 2C19	- anticoagulants oraux : acénocoumarol, warfarine - phénytoïne		
2D6	- antiarythmiques : flecainide, propafénone - thioridazine	- inhibiteurs du recaptage de la sérotonine : fluoxétine, paroxétine - quinidine	
3A4	- alcaloïdes de l'ergot de seigle - antiarythmiques : amiodarone, disopyramide - benzodiazépines : midazolam, triazolam, zolpidem - cisapride - ifosfamide - immunosuppresseurs: ciclosporine, tacrolimus - opioïdes : alfentanil, fentanyl, méthadone - pimoïdine - sildénafil - statines : simvastatine, atorvastatine, cêrivastatine...	- jus de pamplemousse - amiodarone - antagonistes du calcium : diltiazem, vérapamil - antifongiques azolés : kétoconazole, itraconazole, fluconazole, miconazole, - antiprotéases : ritonavir, nelfinavir, amprénavir, indinavir, - macrolides : érythromycine, clarithromycine, josamycine	- alcool (en prise chronique) - tabac - millepertuis - antiépileptiques : carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne - anti-infectieux : rifampicine, rifabutine, éfavirenz, névirapine, griséofulvine

### 1-2-2/ Polymorphismes génétiques.

Les gènes codant les EMTX et les récepteurs nucléaires sont hautement polymorphes (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). A titre d'exemple, plus de 350 allèles de cytochromes P450, présentant un impact fonctionnel, ont été décrits (<http://www.cypalleles.ki.se/>). En effet, la présence de mutations affectant la séquence des gènes codant pour les EMTX ou

les « xénosensors » peut entraîner la synthèse d'une protéine présentant une activité réduite, augmentée ou nulle. Les bases moléculaires à l'origine de variations d'expression et/ou d'activité de ces protéines sont d'ores et déjà en partie élucidées. D'une part, elles se composent de microlésions (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), c'est-à-dire de mutations faux sens ou de mutations ponctuelles telles que celles entraînant un décalage du cadre de lecture (ou frameshift) ou un codon stop. D'autres mutations ponctuelles peuvent affecter la séquence non codante des gènes et être à l'origine d'un défaut d'épissage ou, lorsqu'elles sont situées dans la région promotrice, d'une expression de la protéine altérée. D'autre part, elles regroupent des macrolésions (comme une délétion complète du gène ou à l'inverse d'amplification génique), regroupées sous le terme de variation du nombre de copies de gènes (CNV, Copy Number Variation). Il existe déjà plusieurs exemples bien documentés de CNV touchant des protéines impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques (CYP2A6, CYP2D6, GSTM1, GSTT1, SULT1A1, SULT1A3, UGT2B17). Des anomalies de structure de ce type (qui semblent surtout affecter les gènes ne présentant pas de forte pression de sélection) existent certainement pour d'autres gènes impliqués dans la prise en charge cellulaire de xénobiotiques (Stranger *et al.*, 2007).

### **1-3-3/ Facteurs épigénétiques.**

Des mécanismes épigénétiques sont également susceptibles de moduler le niveau d'expression de nos gènes d'intérêt. Il s'agit surtout de mécanismes de régulation de l'expression des gènes mettant notamment en jeu des processus de méthylation de l'ADN ou des microARN.

#### **Les microARN**

Les micro-ARN (miARN) sont des ARN simple brin d'une longueur de 21 à 24 nucléotides impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Ils interagissent au niveau post-transcriptionnel (en inhibant la traduction ou en induisant la dégradation des ARN messagers cibles) et participent donc au contrôle de l'expression des protéines (Li *et al.*, 2010). On



estime que 30% des ARNm peuvent interagir fonctionnellement avec des miARN. Les miARN interviennent en particulier dans l'apoptose, la croissance et la différenciation cellulaire. La découverte de cette voie de régulation a ouvert de nouveaux horizons dans la compréhension des phénomènes de régulation génique impliqués dans différentes pathologies, notamment néoplasiques, pour lesquelles le niveau d'expression de certains miARN est corrélé à l'agressivité tumorale (Gandellini *et al.*, 2011).

Ainsi, le niveau d'expression d'un miARN, un polymorphisme affectant soit un site potentiel de liaison à un miARN, soit la séquence même d'un miARN pourrait influencer sur le niveau d'expression de ses gènes cibles. L'implication de miARN dans la régulation de gènes de protéines impliquées dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques, a déjà été démontrée pour le CYP1B1 : il existe une corrélation inverse entre les niveaux d'expression de miR-27b et du CYP1B1 (Tsuchiya *et al.*, 2006) ou de miR-378 et du CYP2E1 (Mohri *et al.*, 2010). D'autres gènes d'EMTX sont probablement régulés de cette manière. Des travaux effectués *in silico* confirment cette hypothèse : plusieurs miARN peuvent potentiellement réguler l'expression de 12 cytochromes de la superfamille des CYP (Ramamoorthy *et al.*, 2011).

**La méthylation de l'ADN** est un processus au cours duquel certaines bases nucléotidiques de l'ADN peuvent être modifiées par l'addition d'un groupement méthyle sur la cytosine (ainsi transformée en 5-méthylcytosine) des îlots CpG localisés essentiellement au niveau des promoteurs des gènes. Il s'agit d'un moyen de régulation de l'expression de gènes dont dispose la cellule et qui s'effectue soit en empêchant la fixation de facteurs de transcription dans la région promotrice de ces gènes soit, par des mécanismes indirects plus complexes, faisant intervenir des changements de conformation de la chromatine. Globalement, plus le niveau de méthylation d'un gène est élevé, plus l'expression du gène est faible. Des études ont montré que l'expression des gènes DPYD (Dihydropyrimidine déhydrogénase) (Ezzeldin *et al.*, 2005) et CYP1B1 (Habano *et al.*, 2009) pouvait être modulée par des variations interindividuelles de méthylation. Une analyse bioinformatique

systematique de la séquence des autres gènes humains de ce type montre que bon nombre d'entre eux présentent des sites potentiels de méthylation et par conséquent, pourraient aussi être influencés par des variations interindividuelles de méthylation (Tate *et al.*, 1993). Dans une étude récente, il a été démontré que le niveau d'expression intestinal de PXR et du CYP3A4 était dépendant de la méthylation du promoteur de PXR, pouvant ainsi expliquer une variabilité interindividuelle de réponse clinique aux agents anticancéreux utilisés dans le cancer du colon (Habano *et al.*, 2011)

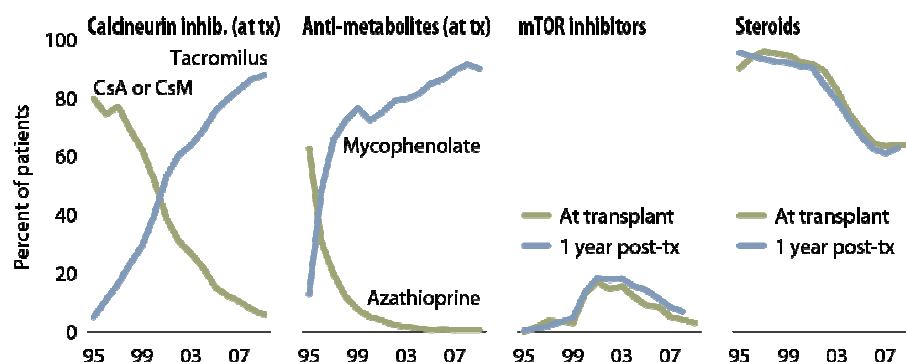
Ces derniers mécanismes pourraient avoir une pertinence toute particulière pour les gènes présentant des variations interindividuelles d'expression mais pour lesquels aucune variation de séquence n'a été identifiée dans leurs régions codantes, promoteurs ou sites consensus d'épissage.

## 2/ La néphrotoxicité induite par le Tac : un modèle clinique de néphrotoxicité chronique.

### 2-1/ Données générales sur le Tacrolimus

L'introduction des traitements par anticalcineurines (ACN) au début des années 1980 a permis l'essor de la médecine de transplantation. En effet, ces traitements ont diminué fortement l'incidence du rejet aigu d'allogreffe et ont ainsi amélioré la survie à court terme du greffon rénal. Ces molécules sont souvent considérées comme des « pierres angulaires » du traitement immunosuppresseur en transplantation d'organe solide.

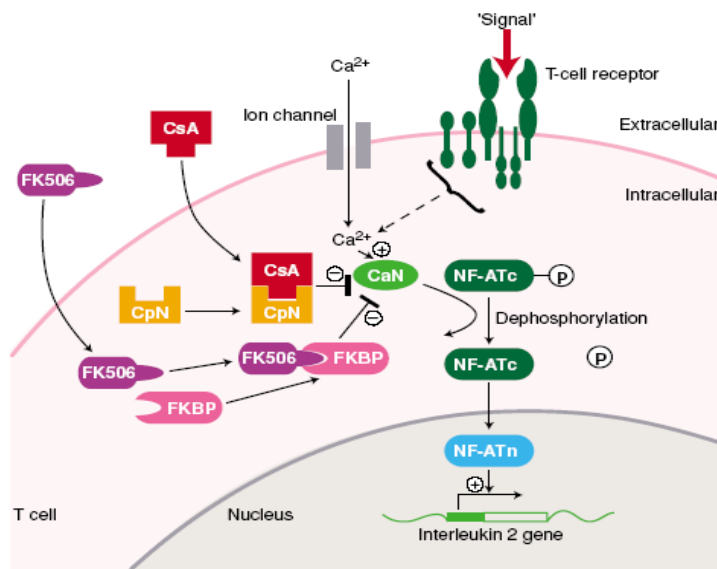
La première molécule mise à disposition fut la Cyclosporine A (CsA). Le Tacrolimus (Tac), historiquement appelé FK506, est disponible sur le marché français depuis 1994. Aux USA, la proportion de patients transplantés rénaux traités par Tac augmente de manière continue depuis 1995 (**Figure 2**) et, selon les données 2011 de l'United State Renal Data System (USRDS), 88% des patients transplantés reçoivent actuellement du Tac à l'issue de la transplantation rénale. Les transplantés rénaux recevant de la CsA comme premier traitement immunosuppresseur ne représentent actuellement que moins de 10% des patients ([http://www.usrds.org/2011/pdf/v2\\_ch07\\_11.pdf](http://www.usrds.org/2011/pdf/v2_ch07_11.pdf)).



**Figure 2 : Evolution entre 1995 et 2009 de la prescription des traitements immunosuppresseurs, administrés en post greffe immédiat, aux Etats Unis. (CsA : cyclosporine, CsM : cyclosporine en microémulsion). Données de l'USRDS ([http://www.usrds.org/2011/pdf/v2\\_ch07\\_11.pdf](http://www.usrds.org/2011/pdf/v2_ch07_11.pdf)).**

## 2-2/ Mode d'action des inhibiteurs de la calcineurine.

Les ACN inhibent l'activation du facteur de transcription NFAT (**Figure 3**). Brièvement, le facteur NFAT est déphosphorylé par la calcineurine (préalablement activée par les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ) puis est transloqué dans le noyau cellulaire. Il stimule alors le promoteur du gène de l'Interleukine-2 (IL-2). Cette cytokine a un rôle particulièrement important dans la prolifération lymphocytaire en réponse à l'agression allogénique. La calcineurine est présente principalement au niveau des lymphocytes, ce qui confère à ces molécules un effet immunosuppresseur assez spécifique malgré l'ubiquité du NFAT (Clipstone *et al.*, 1992). Le Tac (ou FK506) se lie avec une immunophiline, la FK 506-binding protein 12 (FKBP12). Ce complexe Tac-FKBP12 inhibe la calcineurine. La CsA, se lie quant à elle à une autre immunophiline, la cyclophiline. Ce complexe CsA-cyclophiline inhibe l'activation calcium dépendante de la calcineurine (Stepkowski, 2000).



**Figure 3 : Mécanismes d'action de la CsA et du Tac** : FK506 : Tacrolimus, CsA : Cyclosporine, CpN : Cyclophiline, FKBP : FK binding protein 12, CaN : Calcineurine (Stepkowski, 2000).

## **2-3/ Protéines impliquées dans la prise en charge du Tac.**

### **2-3-1/ Données générales sur la pharmacocinétique du Tac.**

Après administration par voie orale (de la forme commerciale Prograf<sup>®</sup>, en 2 prises quotidiennes), l'absorption du Tac est variable avec une concentration sanguine maximale atteinte après environ 1,5 h (0,5-4h), et une biodisponibilité en moyenne de 20% variant entre 6 et 43% (Undre *et al.*, 1999 Wong, 2001). L'absorption est diminuée lorsque le médicament est pris avec les repas (Trull, 1998), mais varie également en fonction de la richesse en lipides du repas.

Le Tac est un produit hautement lipophile avec un volume de distribution apparent élevé d'environ 2,5 L/kg, d'après une estimation à partir des taux sanguins (Regazzi *et al.*, 1999).

Dans le sang, 92-98% du Tac est lié aux érythrocytes ; cependant, cette répartition dépend de sa concentration, de la température et de l'hématocrite (Trull, 1998 ; Wong, 2001). La fraction plasmatique est fortement liée (à plus de 90%) à des protéines (Undre *et al.*, 1999).

Le Tac est très largement métabolisé puisque seul environ 0,5 % de la dose administrée par voie orale se retrouve dans les urines ou les fèces sous forme inchangée (Möller A. *et al.*, 1999). A part le 31-O-déméthyl-tacrolimus, tous les métabolites du Tac présentent *in vitro* une activité immunosuppressive négligeable comparée à celle du Tac. La demi-vie du produit est, en moyenne, de 11,3 heures (valeurs extrêmes : 3,5 à 40,5 heures) (Wallemacq *et al.*, 2001).

Actuellement, en France, deux formulations galéniques sont disponibles sur le marché : le Prograf<sup>®</sup> et l'Advagraf<sup>®</sup>. Cette dernière présentation correspond à une forme galénique de gélules à libération prolongée administrée en une seule prise quotidienne. La pharmacocinétique du produit est globalement modifiée. Plusieurs études ont été réalisées afin de comparer l'exposition au Tac, dans ces deux formes galéniques.

Ces études, effectuées en transplantation rénale, ayant permis l'octroi de l'AMM de l'Advagraf® ont montré que :

- chez des transplantés de novo (Silva *et al.*, 2007; Undre, 2008), pour une posologie fixe de Tac (0.2 mg/kg/j), l'aire sous la courbe des 24 heures (AUC(0-24h)) du Tac est plus basse de 20 à 30% à J1 après transplantation rénale chez les patients sous Advagraf® par rapport aux patients traités par Prograf®. Les AUC(0-24h) et les C0 de Tac sont ensuite comparables entre les 2 formulations à partir de J3. Le profil d'efficacité et de tolérance du Tac est similaire sous Prograf® et sous Advagraf®.

- chez des patients stables traités initialement par Prograf®, et convertis vers Advagraf® sur la base d'une équivalence 1:1 mg (Alloway *et al.*; 2005, 2007), l'exposition au Tac est comparable entre les deux formulations. L'exposition moyenne au Tac sous Advagraf® varie, par rapport au Prograf®, dans 90% des cas entre -20% à +25% avec une bonne corrélation entre le C0 et l'AUC(0-24h) sous Prograf® et sous Advagraf®.

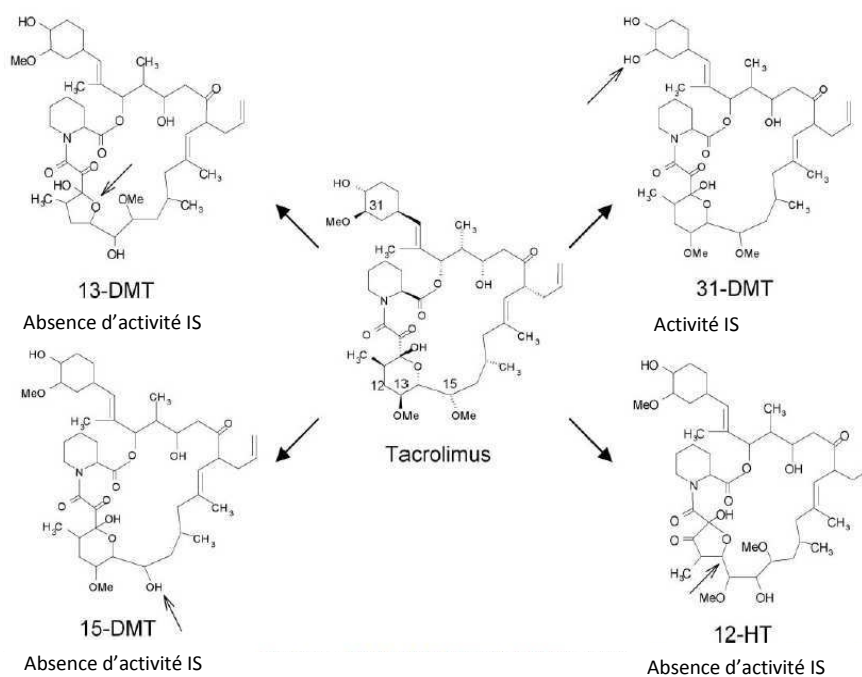
### **2-3-2/ Protéines impliquées dans la prise en charge cellulaire du Tac.**

On peut décomposer les différents enzymes et transporteurs prenant en charge le Tac selon leur type :

#### ➤ Protéines de phase I.

Les réactions d'O-déméthylation et d'hydroxylation sont principalement catalysées par des enzymes de la superfamille des cytochromes P450, et plus précisément par des membres de la sous-famille CYP3A, les CYP3A4 et 3A5. Ces réactions conduisent à des composés plus hydrophiles. Quatre métabolites primaires majoritaires du Tac ont été identifiés après incubation de microsomes hépatiques de rat avec du Tac (Iwasaki *et al.*, 1993, 1995). Ces métabolites sont le 13-O-desmethyl tacrolimus (13-DMT ou M-I), le 15-O-desmethyl tacrolimus (15-DMT ou M-III), le 31-O-desmethyl tacrolimus (31-DMT ou M-II), et le 12-hydroxy tacrolimus (12-HT ou M-VI) (Dai *et al.*, 2006) (**Figure 4**).

Un travail récent a évalué, sur une cohorte de 53 patients transplantés, la concentration respective des différents métabolites par rapport à la concentration sanguine en Tac. Alors que la concentration en Tac est en moyenne de 7.2 ng/mL ; elle est de 0.8 ng/mL pour M-I, 0.4 ng/mL pour M-III, et de 0.2 ng/mL for M-II. La concentration en métabolites représente en moyenne 17% (4%-52%) de la concentration sanguine en Tac (Dubbelboer *et al*, 2012). Une évaluation *in vitro* (Iwasaki, et al, 1993), par réaction mixte lymphocytaire, montre que seul le 31-O-desmethyl tacrolimus possède une activité immunosuppressive significative (les autres métabolites n'inhibent pas l'activation lymphocytaire T).



**Figure 4: Principaux métabolites du Tac** (D'après Dai *et al.*, 2006) ; Activité IS ou absence d'activité IS : effet immunosuppresseur (IS) connu du métabolites.

Les CYP3A4 et CYP3A5 sont exprimés par les cellules épithéliales intestinales, hépatiques et rénales. Ils interviennent ainsi aux différentes étapes de la prise en charge du Tac (absorption, diffusion, métabolisme, élimination).

➤ Protéines de phase II.

Des protéines de phase II sont impliquées de manière très minoritaire dans l'élimination du Tac (Firdaous *et al.*, 1997). Plus précisément, les réactions assurées par ces enzymes permettent le transfert d'un radical hydrophile, l'acide glucuronique, pour produire des composés plus hydrosolubles pouvant être excrétés par voies rénale et/ou biliaire. Ces réactions pourraient être attribuées à l'action des UGT2B7, UGT1A8 et UGT1A9 (Strassburg *et al.*, 2001).

➤ Protéines de phase III.

Les protéines de phase III, quant à elles, assurent le transport actif du Tac et de ses métabolites hors de la cellule (Gerloff *et al.*, 2004). La glycoprotéine-P (Pg-P) ou ABCB1, codée par le gène *ABCB1* (ou *MRP1* dans l'ancienne nomenclature), semble être la plus importante pour la disponibilité du Tac (Utecht *et al.*, 2006).

Par son rôle de transporteur d'efflux, la Pg-P limite donc l'absorption digestive du Tac, ainsi que les effets toxiques de la molécule dans certains tissus où elle est exprimée (barrière hémato-encéphalique, placenta, foie, rein...). Ainsi dans un modèle de souris transgénique invalidée pour le gène *ABCB1*, exposée au Tac, la concentration intra-cérébrale de Tac augmente rapidement jusqu'à 10 fois la valeur observée chez les souris contrôles (Yokogawa *et al.*, 1999).

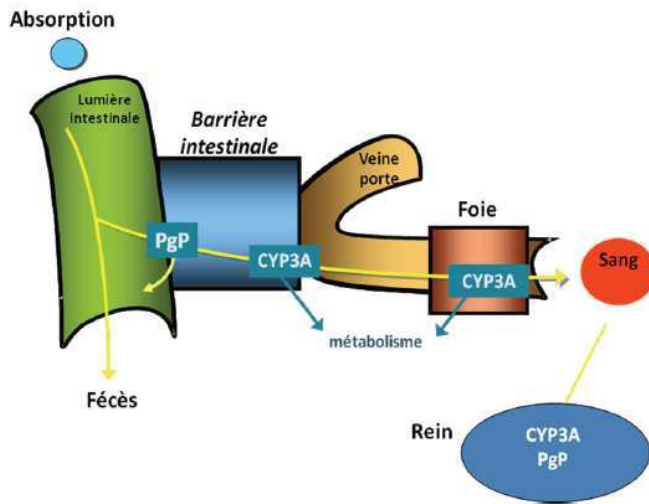
Au cours des phénomènes d'absorption digestive, les CYP3A4 et CYP3A5 agissent de manière synergique avec ABCB1, entraînant une diminution de l'absorption et de la biodisponibilité du Tac (Zhang *et al.*, 2001).

➤ Xénosensors.

Le pregnane X receptor (PXR ou NR1I2) fait partie des régulateurs transcriptionnels du CYP3A4, de ABCB1 et potentiellement du CYP3A5 (Hodgson et Rose, 2007). Son niveau d'expression pourrait donc influencer le devenir cellulaire du Tac.



La **figure 5** reprend schématiquement les différents acteurs et les grandes étapes du métabolisme et de la prise en charge cellulaire du Tac.



**Figure 5 : Schéma général de la prise en charge du Tac par les CYP3A4, CYP3A5 (regroupés sous le terme CYP3A) et Pg-P.**

### 2-3-3/ Polymorphismes génétiques affectant les *CYP3A4*, *CYP3A5* et *ABCB1*.

Des polymorphismes génétiques affectant les gènes codant pour les 3 protéines majeures de la prise en charge du Tac (*CYP3A4*, *CYP3A5* et *ABCB1*) peuvent être à l'origine de variations qualitatives et/ou quantitatives d'expression de ces protéines, et ainsi expliquer une variabilité interindividuelle des capacités de prise en charge du Tac.

#### ➤ Polymorphisme génétique du *CYP3A4*

A ce jour, 42 SNPs sont décrits pour le *CYP3A4* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>). Historiquement, le SNP le plus étudié correspond à la substitution A en G en position -392 (rs2740574) dans la région flanquante-5'. Cette région possède une séquence dite NFSE (nifedipine-specific element) (Rebeck *et al.*, 1998). Ce variant est dénommé *CYP3A4\*1B*, alors que l'allèle sauvage est noté *CYP3A4\*1*. Les conséquences fonctionnelles de cette mutation ont été explorées *in vitro* et *in vivo* et restent contradictoires. Alors que certains

travaux rapportent *in vitro* une augmentation de l'activité transcriptionnelle du CYP3A4, les études *in vivo* ne montrent pas d'impact sur le métabolisme de médicaments tests comme la nifédipine ou l'érythromycine (Ball *et al.*, 1999). L'allèle *CYP3A4\*1B* est présent chez 2% à 9,6% des Caucasiens contre 35 à 67% des Africains. Par contre, ce variant n'est pas décrit dans les populations Asiatiques (Lamba *et al.*, 2002).

Un autre polymorphisme C>T situé dans le 6ème intron de *CYP3A4* (rs35599367 ; *CYP3A4\*22*) pourrait avoir des conséquences fonctionnelles sur les capacités métaboliques de différents médicaments dont le Tac (Lampen *et al.*, 1995 ; Elens *et al.*, 2011a ; Elens *et al.*, 2011b). Ce polymorphisme intronique influence fortement l'expression tissulaire hépatique du CYP3A4 : les patients homozygotes CC pour cette mutation ont une concentration tissulaire hépatique d'ARN messenger et une activité enzymatique CYP3A4 en moyenne 2,5 fois plus importante que les patients homozygotes TT (Wang *et al.*, 2011).

#### ➤ Polymorphisme génétique du CYP3A5

Vingt et un SNP sont décrits pour le *CYP3A5* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a5.htm>). Le SNP le plus étudié concerne la mutation A>G en position 6986 (rs776746), localisée dans l'intron 3. Alors que la nomenclature considère l'allèle *CYP3A5\*1* comme sauvage, et l'allèle *CYP3A5\*3* comme le variant muté, la fréquence de l'allèle *CYP3A5\*1* est plus faible. La fréquence de l'allèle *CYP3A5\*1* ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation)) est fortement dépendante de l'origine ethnique, variant de 5 à 15% chez les caucasiens à 45-75% chez les Afro-Américains (Xie *et al.*, 2004).

La présence de variant entraîne un défaut d'excision-épissage. Les patients porteurs de l'allèle *CYP3A5\*1* à l'état hétérozygote ou homozygote expriment fortement la protéine CYP3A5, et sont qualifiés de patients « fonctionnels » ou « exprimant CYP3A5 ». Au contraire, les patients homozygotes *CYP3A5\*3/\*3* n'expriment que très peu ou pas la protéine CYP3A5. En théorie, leur capacité métabolique vis-à-vis de différentes drogues, dont le Tac, est donc fortement réduite.

➤ Polymorphisme génétique de ABCB1.

*ABCB1* est un gène hautement polymorphe. Soixante-six SNP sont actuellement décrits dans les séquences codantes (24 synonymes, 42 non synonymes) (Wolf *et al.*, 2011). Sur ce gène, trois polymorphismes génétiques ont été étudiés de manière plus approfondie.

Deux SNP sont synonymes : il s'agit de la substitution 3435 C>T (Ile1145Ile) dans l'exon 26 (rs1045642) et de la substitution 1236 C>T (Gly412Gly) dans l'exon 12 (rs1128503). Le SNP silencieux 3435C>T entraîne cependant une diminution du niveau d'expression de l'ARNm via une diminution de la stabilité de ce transcrit (Wang *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que la mutation synonyme 3435 C>T peut entraîner une modification de la conformation spatiale de la protéine, qui peut modifier l'affinité de la protéine pour certains xénobiotiques (Kimchy-Sarfaty *et al.*, 2007). Certains auteurs ont démontré que les porteurs du variant *ABCB1* 3435TT présentaient *in vivo* une expression ou une activité réduite de Pg-P dans leurs cellules épithéliales intestinales (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Ainsi, ce type de polymorphismes génétiques pourrait être déterminant dans la variabilité interindividuelle de pharmacocinétique des médicaments. Dans le rein, la Pg-P est exprimée au pôle apical des cellules tubulaires proximales et distales (Naesens *et al.*, 2009a). Dans ce travail (utilisant des techniques d'immunohistochimie sur des biopsies de greffon rénal), il n'a pu être observé de relation entre l'expression tubulaire de Pg-P et le statut génétique *ABCB1* 3435C>T.

Enfin, le SNP affectant l'exon 21 2677 G>T/A Ala893Ser/Thr (rs2032582), est non synonyme et induit la modification d'un acide aminé dans la protéine.

Ces trois SNP sont en déséquilibre de liaison les uns avec les autres. Il est donc extrêmement difficile de séparer les conséquences biologiques de chacun de ces variants. L'haplotype *ABCB1* 1236T-2677T-3435T est observé chez 32% des caucasiens, 13% des afro-américains et 31% des asiatiques (Benish *et al.*, 2010).

## 2-4/ Néphrotoxicité du Tac.

Les premiers effets néphrotoxiques des ACN ont été décrits avec la CsA (Calne *et al.*, 1978, Calne *et al.*, 1979). La littérature a ensuite souvent assimilé les effets néphrotoxiques de la CsA à ceux du Tac, les confondant ainsi dans les phénomènes de néphrotoxicité induits par les ACN. Les observations de néphrotoxicité ont d'abord concerné des phénomènes réversibles d'insuffisance rénale aiguë fonctionnelle hémodynamique (Klintmalm *et al.*, 1981 ; Morris *et al.*, 1983). C'est à partir de 1984 que Myers *et al.*, décrivent, chez des transplantés cardiaques, des phénomènes d'insuffisance rénale chronique associés histologiquement à des lésions tubulo-interstitielles et à une glomérulosclérose (Myers *et al.*, 1984). Cette entité sera alors dénommée « néphrotoxicité chronique des ACN », par opposition aux phénomènes décrits jusqu'alors de « néphrotoxicité aiguë des ACN ».

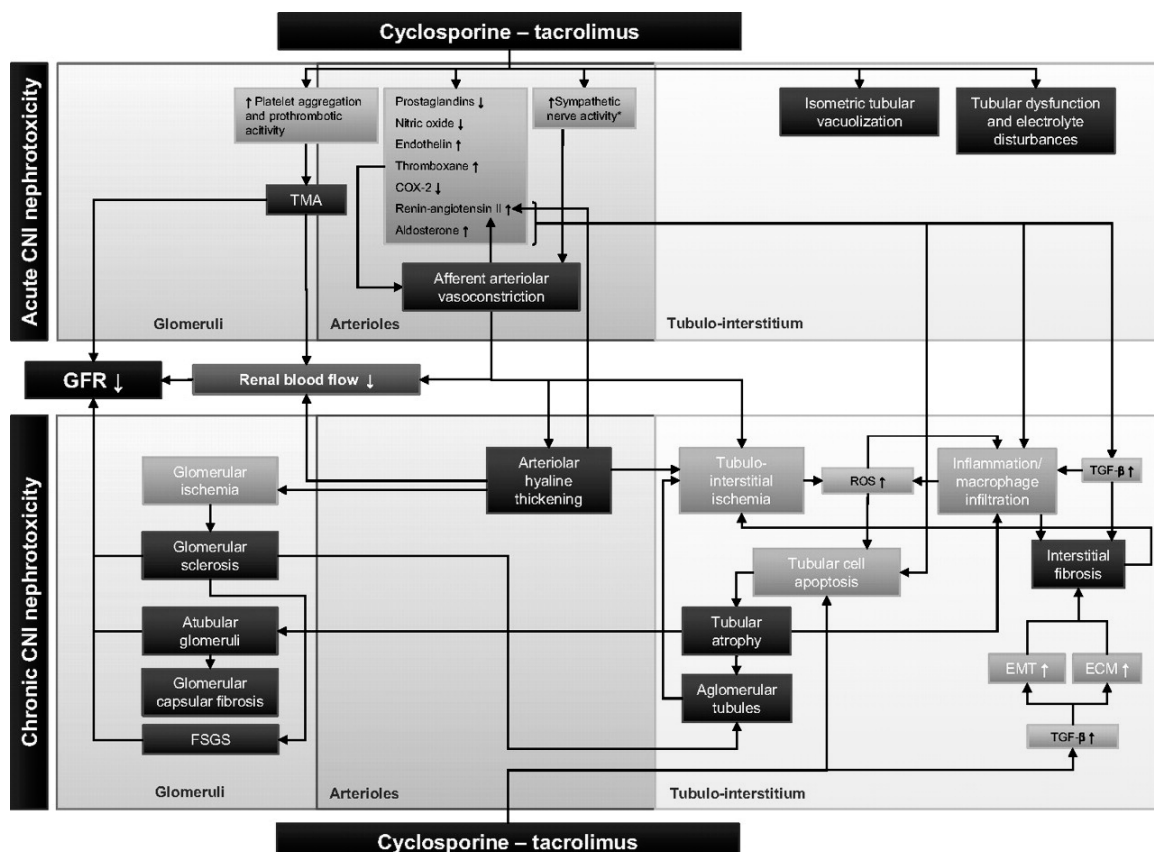


Figure 6: Représentation schématique des différentes composantes physiopathologiques de la néphrotoxicité aiguë et chronique des ACN, dans les différentes structures histologiques rénales (Glomérules, Artérioles, Compartiment tubulo-interstitiel). (Naesens *et al.*, 2009b)

Les différentes voies impliquées dans la survenue de phénomènes de toxicité aiguë et chronique sont décrites dans la **Figure 6**. Bien que schématique, cet organigramme illustre la complexité des différents mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

#### **2-4-1/ Néphrotoxicité aiguë des anticalcineurines.**

##### Effets hémodynamiques.

Ils entraînent un profil d'insuffisance rénale aiguë fonctionnelle hémodynamique. Ces effets ont principalement (et historiquement) été démontrés après utilisation de la CsA. Ces effets hémodynamiques sont également décrits sous Tac, ce qui suggère qu'ils sont la conséquence d'une action directe des ACN sur la voie calcineurine/NFAT.

L'insuffisance rénale aiguë fonctionnelle hémodynamique est la conséquence d'une augmentation des résistances vasculaires rénales (Barros *et al.*, 1987) *via* la production de facteurs vasoconstricteurs et la diminution de facteurs vasodilatateurs. Les différents facteurs susceptibles de déplacer l'équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation sont :

- la sécrétion d'endothéline (Textor *et al.*, 1995). L'effet central de l'endothéline dans les phénomènes de vasoconstriction fut particulièrement bien mis en évidence par des expériences de blocage par des Anticorps anti-endothéline qui prévenaient, chez le rat, la toxicité aiguë des ACN.
- l'activation du système rénine angiotensine aldostérone (SRA). Elle s'effectue d'abord par un effet direct des ACN sur les cellules juxta-glomérulaires (Kurtz *et al.*, 1988) qui peuvent parfois conduire à l'hyperplasie de l'appareil juxta-glomérulaire et un effet indirect par une réponse aux variations de l'hémodynamique intra-rénale. Cet effet participe à la création d'un cercle vicieux en réduisant encore le flux sanguin rénal. Au delà de l'activation du SRA, il a été démontré que la CsA augmentait la contractilité des cellules musculaires lisses, probablement en modifiant les flux calciques (Lassila *et al.*, 2002).

- la modification de l'équilibre entre les agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs issus du métabolisme de l'acide arachidonique par la Cyclooxygénase-2 (COX-2). Le Tac, comme la CsA, exercent un effet répresseur sur l'expression rénale de COX-2 (Hocherl *et al.*, 2002). Ainsi, par certains aspects, l'utilisation des ACN peut provoquer des effets indésirables qui rappellent ceux décrits avec les anti-inflammatoires anti-COX2 (hyperkaliémie, rétention sodée, hypertension artérielle induite par la vasoconstriction).
- l'inhibition de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) et de la réponse vasodilatatrice au NO (Hortelano *et al.*, 2000). Il a été démontré que la CsA inhibait la production de NO par l'isoforme endothéliale NO synthétase (eNOS) (Kou *et al.*, 2002). Il convient de remarquer que la phosphorylation de eNOS est probablement dépendante d'une interaction avec la Cavéoline-1 (García-Cardena *et al.*, 1996).
- Enfin, sur les reins natifs uniquement, la CsA stimule l'activité nerveuse sympathique, ce qui tend encore à augmenter le tonus vasculaire. Cette activité ne concerne pas les greffons rénaux qui ont été dénervés lors de la procédure chirurgicale (Moss *et al.* 1985).

#### Toxicité tubulaire aiguë.

La toxicité tubulaire aiguë des anticalcineurines se caractérise par l'apparition de vacuoles isométriques dans le cytoplasme des cellules tubulaires (Naesens *et al.*, 2007), qui sont la conséquence d'une augmentation de la taille (dilatation) du réticulum endoplasmique et des lysosomes. Ces lésions sont réversibles et n'évoluent pas directement vers une néphropathie chronique irréversible.

Il convient d'être prudent sur l'imputabilité directe des ACN dans la survenue de ce type de lésions. En effet des lésions de néphrose osmotique produisent des tableaux histologiques quasiment similaires de vacuolisation des cellules tubulaires. Ces néphroses osmotiques peuvent être secondaires à l'utilisation de solutés hyperosmolaires (par exemple lors de l'utilisation de solutés de remplissage vasculaire à base d'hydroxy-ethyl-amidon durant la réanimation des donneurs).

### Microangiopathies thrombotiques.

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) observées *de novo* après transplantation rénale sont la conséquence de nombreux facteurs à la fois environnementaux et probablement génétiques. Par leurs effets sur les cellules endothéliales, les ACN peuvent faciliter et aggraver le développement de lésions de MAT (Ponticelli *et al.*, 2007).

### **2-4-2/ Néphrotoxicité chronique des anticalcineurines.**

Tous les compartiments du parenchyme rénal peuvent être affectés par une toxicité irréversible des anticalcineurines. L'atteinte vasculaire conduit à une hyalinose artériolaire, l'atteinte tubulo-interstielle à une fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire (FI/AT), et l'atteinte glomérulaire à un épaississement de la capsule de Bowman et à de possibles lésions de hyalinose segmentaire et focale.

### Lésions vasculaires.

La hyalinose artériolaire est considérée comme la lésion vasculaire la plus caractéristique de toxicité vasculaire des ACN. Cette hyalinose correspond à des dépôts protéiques qui remplacent les cellules musculaires lisses nécrosées. Les dépôts hyalins peuvent être focaux ou circulaires, et prédominent à la périphérie de la paroi des artéioles afférentes. Ils peuvent entraîner un rétrécissement de la lumière artériolaire (Sis *et al.*, 2006).

Ces lésions sont classiquement décrites comme irréversibles. Cependant, certaines études cliniques ont démontré des possibilités de remodelage de la paroi vasculaire et de réduction des lésions de hyalinose artériolaire après la diminution ou l'arrêt des ACN (Collins *et al.*, 1992 ; Morozumi *et al.*, 1992).

La physiopathologie des lésions vasculaires demeure obscure. Compte tenu de l'importance de la voie Calcineurine/NFAT dans la physiologie de la cellule musculaire lisse (Graef *et al.*, 2001), l'hypothèse d'un effet direct du blocage de cette voie dans la genèse des lésions vasculaires pourrait être évoquée.

### Lésions tubulo-interstitielles.

Les lésions artériolaires conduisent à une ischémie locale du compartiment tubulo-interstitiel, au développement de lésions de fibrose interstitielle (typiquement en bande) accompagné d'une atrophie tubulaire et à la sclérose glomérulaire.

Différents mécanismes concourent au développement de ces lésions fibreuses.

- L'hypoxie induite par les ACN (épisodes répétés de vasoconstriction/retour à un tonus vasculaire normal en fonction des prises thérapeutiques d'ACN) est à l'origine de la formation de radicaux libres. Ces derniers favorisent la mort cellulaire par apoptose. Un effet directement pro-oxydant de la CsA est évoqué par certains auteurs. *In vitro*, l'exposition de cellules tubulaires à de la CsA génère la libération de radicaux libres (Galletti *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études *ex vivo* montrent que la CsA n'a pas d'effet direct sur l'oxydation lipidique (Kandoussi *et al.*, 2001).
- Une augmentation de l'expression du TGF $\beta$  par les cellules tubulaires rénales exposées à la CsA ou au Tac (Khanna *et al.*, 2002). Le TGF $\beta$  favorise la fibrose en induisant la synthèse de protéines de la matrice extra-cellulaire et en inhibant les systèmes chargés de sa dégradation (Border *et al.*, 1994).

Par ailleurs le TGF $\beta$  stimule des phénomènes de modifications phénotypiques des cellules épithéliales par un processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) au cours duquel les cellules tubulaires perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés de cellules fibroblastiques (Pallet *et al.*, in Actualités Néphrologiques Néphrologiques 2008 : [http://www.soc-nephrologie.org/PDF/enephro/publications/actualites/2008/2008\\_09.pdf](http://www.soc-nephrologie.org/PDF/enephro/publications/actualites/2008/2008_09.pdf)).

Le processus de TEM semble particulièrement important dans les phénomènes de néphrotoxicité chronique des ACN. Dans une cohorte de patients transplantés traités par CsA, Hazzan *et al.* (2011) ont démontré que, sous CsA, la TEM évaluée sur des biopsies de greffon systématique à 3 mois était prédictive de la dysfonction du greffon à 4 ans (parallèlement à une aggravation des scores de TEM entre 3 et 12 mois). À l'inverse,



chez les patients sevrés de CsA à 3 mois il était observé à 1 an une diminution d'expression de leurs marqueurs de TEM. Ces éléments suggèrent donc que la CsA induit *in vivo* un processus de TEM. Ce mécanisme peut jouer un rôle majeur dans l'apparition de la fibrose du greffon (Hazzan *et al.*, 2011).

➤ Les effets pléiotropiques de l'activation du SRA.

L'activation du SRA (cf supra) a des effets qui dépassent largement les simples modifications hémodynamiques. L'angiotensine-2 stimule directement la production de TGF $\beta$  (Wolf *et al.*, 2006). L'aldostérone stimule également la production de TGF $\beta$ , de radicaux libres et inhibe la production d'enzymes de dégradation de la matrice extra cellulaire (Remuzzi *et al.*, 2008).

Il faut néanmoins garder en mémoire que les lésions de fibrose interstitielle observées sur les biopsies de greffon ne sont pas spécifiques de la toxicité du Tac et peuvent également résulter des multiples agressions subies par le greffon rénal (lésions préexistantes du donneur, agressions allogéniques...)

Lésions glomérulaires.

Les lésions de sclérose glomérulaire sont secondaires à l'ischémie induite par les lésions vasculaires de hyalinose artériolaire (Nankivell *et al.*, 2004). Ce processus est globalement semblable à ce qui est observé dans la néphropathie diabétique. Par ailleurs, les lésions tubulaires conduisent à la déconnexion du glomérule et de l'appareil tubulaire. Ces glomérules dits « atubulaires » sont de petites tailles, et leur capsule de Bowman est épaissie par un processus fibreux. Enfin, des phénomènes aspécifiques de hyalinose segmentaire et focale peuvent être observés (Cosio *et al.*, 1999).

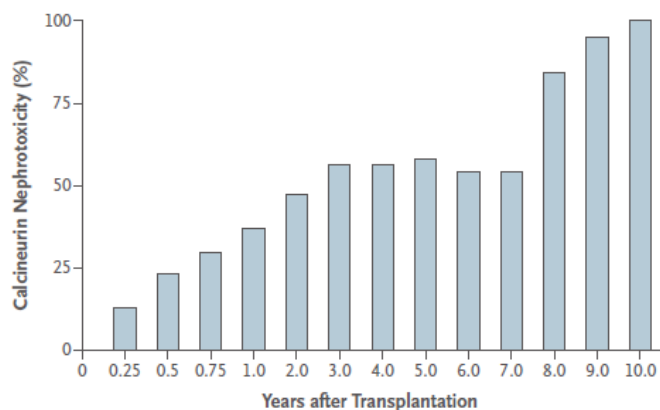
Troubles hydroélectrolytiques.

Lors de l'utilisation d'ACN, il est fréquent d'observer, *a minima*, différentes modifications hydro-électrolytiques telles que : une hypomagnésémie avec hypermagnésurie, une hyperkaliémie, une acidose tubulaire distale et une hyperuricémie. La diminution de

l'expression du co-transport  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  induite par les ACN peut expliquer, au moins partiellement, ces anomalies (Snanoudj *et al.*, 2009).

#### Cinétique d'apparition des lésions chroniques.

Les lésions apparaissent de manière progressive au fil du temps. Nankivell *et al.* (2003), ont décrit l'émergence très progressive de ces lésions dans une série de 119 patients transplantés rein-pancréas, traités par CsA ou Tac, et biopsiés systématiquement de manière annuelle pendant 10 ans. Globalement, l'évolution histologique peut être divisée en 2 stades. Les lésions précoces sont principalement liées à la réaction alloimmune. Les lésions plus tardives (après 1 an), quant à elles sont assez peu liées à des mécanismes alloimmuns, mais plutôt aux lésions de néphrotoxicité (lesquelles prendront une importance croissante au fil du temps). A long terme, 100% des greffons rénaux présentent des signes de néphrotoxicité (**Figure 7**). Néanmoins, dans ce type d'étude sans groupe contrôle, il est impossible d'analyser la participation relative des différents déterminants physiopathologiques (néphrotoxicité, agression alloimmune...) dans la survenue des lésions histologiques décrites, notamment dans les lésions de FI/AT.



**Figure 7 : Prévalence au fil du temps des lésions de néphrotoxicité induite par les ACN** chez des patients transplantés rein-pancréas suivis de manière périodique par des biopsies systématiques du greffon rénal (Nankivell *et al.*, 2003).

### **3/ Déterminants de la néphrotoxicité induite par le Tac.**

#### **3-1/ Facteurs systémiques.**

##### **3-1-1/ Paramètres cinétiques et niveaux d'exposition systémique (C0, AUC) au Tac.**

Historiquement, la posologie et le niveau de concentration sanguine de CsA ont très rapidement été corrélés à la survenue d'une néphrotoxicité clinique. De même, dès sa mise sur le marché, les premières études de phase III ont montré que les concentrations sanguines de Tac étaient déterminantes dans l'effet immunosuppresseur et dans la survenue d'une néphrotoxicité (Laskow *et al.*, 1996, Vincenti *et al.*, 1996). Dans ces premières études, les dosages sanguins résiduels de Tac (C0) oscillaient dans une fourchette très large entre 5 et 40 ng/mL. Dès lors, il apparaissait que l'index thérapeutique du Tac est étroit, avec des valeurs cibles de dosage résiduel comprises entre 5 et 15 ng/mL.

Le C0 de Tac est bien corrélé à l'aire sous la courbe 0-12h (AUC0-12). Le C0 du Tac est donc admis comme un indicateur assez fiable du niveau global d'exposition au médicament (Oellerich *et al.*, 2006). Cependant, les techniques utilisant des estimateurs Bayésiens pour évaluer l'aire sous la courbe (à partir d'un nombre limité de mesures de concentration sanguine de Tac) paraissent avoir une meilleure fiabilité pour estimer le niveau d'exposition systémique au Tac (Kuypers *et al.*, 2004).

Pour la CsA, la corrélation entre AUC et C0 est assez médiocre. Il a donc été proposé d'utiliser la concentration sanguine 2h (C2) après la prise, plus satisfaisante, pour juger de l'exposition à la molécule. Néanmoins, une étude clinique n'a pu mettre en évidence le bénéfice clinique d'un suivi thérapeutique à partir du C2 par rapport au C0 (Kuypers *et al.*, 2004). Ainsi, il apparaît que le suivi thérapeutique des patients traités par CsA soit globalement plus difficile que celui des patients sous Tac. Cette différence pourrait, au moins partiellement, expliquer que la CsA soit décrite comme plus néphrotoxique que le Tac. Cependant, il convient de modérer ce propos, et de rappeler qu'actuellement aucune

modalité de suivi thérapeutique des ACN ne permet de s'affranchir complètement du risque néphrotoxique.

Les protocoles actuels d'immunosuppression visent à utiliser des posologies minimales de Tac, afin de réduire les phénomènes de toxicité, tout en conservant une efficacité satisfaisante dans la prévention du rejet. L'étude ELITE-Symphony (Ekberg *et al.*, 2007) a comparé des protocoles utilisant : (i) des posologies usuelles de CsA, (ii) des posologies réduites de CsA, (iii) des posologies réduites de Sirolimus et (iv) des posologies réduites de Tac (initialement : 0,1 mg/kg/j, ensuite ajustée pour obtenir des dosages sanguins résiduels (C0) entre 3 et 7 ng/mL). Dans cette étude randomisée, l'utilisation de doses réduites de Tac permet d'obtenir la meilleure fonction rénale à 1 an de greffe, la meilleure survie du greffon, et le plus faible taux de rejet aigu. Il faut cependant remarquer que, durant la première année de greffe, les valeurs de C0 de Tac étaient plus proches de la borne haute de la cible que de la borne basse et que le groupe contrôle utilisait de la CsA à posologie conventionnelle et non du Tac. Lors du suivi à 3 ans de cette cohorte (Ekberg *et al.*, 2009), il apparaît que si l'avantage sur la fonction rénale du Tac faible dose persiste, la différence de débit de filtration glomérulaire estimée entre les 4 bras de l'étude n'est plus statistiquement significative. Enfin, dans cette étude, aucune biopsie systématique n'a été réalisée. Les différences de fonction rénale observées entre les bras de l'étude ne sont donc peut être pas uniquement liées qu'à une moindre néphrotoxicité. Un meilleur contrôle de la réaction allogénique pourrait participer à ces résultats.

Le caractère directement dose dépendant de la toxicité de la CsA est également difficile à appréhender. En effet, dans l'étude ELITE-Symphony (Ekberg *et al.*, 2007), il n'est pas observé de différence de fonction rénale entre les patients soumis à une dose conventionnelle de CsA, et ceux soumis à une posologie réduite. En transplantation cardiaque, les patients traités avec des posologies réduites, ou plus élevées de CsA ( $4,6 \pm 0,4$  versus  $6,3 \pm 0,3$  mg/kg/j,  $p < 0.01$ ) développent les mêmes lésions histologiques de néphrotoxicité (Myers *et al.*, 1988). De même, pour Zietse *et al.*, la fonction rénale des

transplantés cardiaques traités par CsA est indépendante des niveaux observés de cyclosporinémies (Zietse *et al.*, 1994).

Ainsi, dans les études les plus anciennes, il apparaissait que lorsque des doses particulièrement élevées d'ACN étaient utilisées il était mis en évidence une relation directe dose/toxicité. Ces données doivent être revues à l'aune des conditions actuelles de suivi thérapeutique où les cibles thérapeutiques sont maintenues plus étroites, et les posologies d'ACN revue à la baisse. Dans les conditions actuelles d'utilisation des ACN, et surtout du monitoring biologique très régulier qui est organisé, il est probable que la néphrotoxicité des ACN ne soit pas sous l'unique dépendance de l'exposition systémique aux produits.

### **3-1-2/ Impact du polymorphisme génétique du receveur et exposition aux ACN.**

Il existe une grande variabilité inter- et intra-individuelle de la pharmacocinétique du Tac qui rend complexe la prévision du rapport entre dose et concentration. Cette variabilité s'opère à tous les niveaux de la prise en charge cellulaire du médicament (absorption, distribution, métabolisme et élimination), et explique la faible corrélation qui est décrite entre les posologies de Tac et l'exposition réelle au produit (Staatz *et al.*, 2004).

De nombreuses études pharmacogénétiques ont mis en évidence l'impact de SNPs des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans la prise en charge du Tac sur la pharmacocinétique et l'exposition au produit. L'ensemble de ces données pharmacogénétiques a été obtenu chez des patients traités par Prograf®.

#### **3-1-2-1/ Impact des polymorphismes génétiques de CYP3A5.**

**Effet de l'allèle CYP3A5\*3 :** Les travaux sont concordants quant à l'effet du polymorphisme CYP3A5\*3 sur l'exposition au Tac.

Staatz *et al.* (2010) ont répertorié 23 études observationnelles (rassemblant 1553 transplantés rénaux) réalisées chez des receveurs de toutes origines ethniques. Les résultats de ces études sont globalement très cohérents. Par comparaison aux patients

*CYP3A5\*3/\*3*, les patients exprimant le *CYP3A5* (c'est-à-dire porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5\*1*) ont des capacités métaboliques accrues vis-à-vis du Tac. Ils nécessitent donc des posologies de Tac plus importantes pour maintenir une exposition jugée suffisante (Staatz *et al.*, 2010). Cependant, ce polymorphisme génétique du *CYP3A5* n'explique que très partiellement la variabilité interindividuelle d'exposition au Tac (30% de la variabilité selon Press *et al.* (2009)).

Après les premières études observationnelles, il a été proposé d'adapter les posologies de Tac en fonction de l'allèle *CYP3A5\*3* du receveur (Haufrond *et al.*, 2006). Ces recommandations avaient pour objectif d'atteindre plus rapidement, après la greffe, des C0 efficaces et non toxiques de Tac. Elles consistaient à (i) doubler les posologies initiales de Tac chez les sujets porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5\*1* (0,3 mg/kg/j) et (ii) à réduire cette posologie à 0,15 mg/kg/j chez les receveurs *CYP3A5\*3/\*3*.

La conférence 2010 de l' « European Science Foundation– University of Barcelona (ESF– UB) » a ensuite proposé d'adapter les posologies initiales de Tac en fonction du statut *CYP3A5* du receveur avec un schéma légèrement différent: 0,15 mg/kg/j pour les receveurs *CYP3A5\*3/\*3*, 0,2 mg/kg/j pour les receveurs *CYP3A5\*1/\*3* et 0,25 mg/kg/j pour les receveurs homozygotes *CYP3A5\*1/\*1*. L'adaptation par un tel schéma permet d'obtenir plus rapidement une exposition au Tac dans les cibles souhaitables (Becquemont *et al.*, 2011). Ces recommandations d'utilisation d'un marqueur pharmacogénétique ne sont toutefois actuellement pas relayées par les autorités de santé européennes (European Medicine Agency) ou américaines (Food and Drug Administration). Ces propositions d'adaptation de doses en fonction du statut *CYP3A5* font également suite à l'étude prospective menée par Thervet *et al.* (2010). Ce travail a comparé une stratégie d'adaptation *a priori* des posologies de Tac selon le statut *CYP3A5* du receveur *versus* une stratégie usuelle d'adaptation des doses, au fil de l'eau, selon les résultats du suivi pharmacologique. Dans cette étude, les patients ayant bénéficié d'une adaptation en fonction de leur génotype atteignent plus rapidement les cibles de C0. Cependant après 3 mois, il n'existe pas de bénéfice clinique à

une telle attitude : la fonction rénale, l'incidence du retard de fonctionnement de greffon et du rejet aigu sont similaires dans les deux bras de l'étude. Des études rétrospectives antérieures avaient déjà montré l'absence d'effet du *CYP3A5\*1* dans la survenue de rejets aigus (Hesselink *et al.*, 2008). De même, Naesens *et al.* (2009b) n'observent aucun effet de l'allèle *CYP3A5\*1* du receveur sur l'incidence de rejet, la fonction du greffon, ou le développement de lésions histologiques de néphrotoxicité.

Les résultats de ces études sont à mettre en perspective avec le suivi thérapeutique pharmacologique qui est actuellement organisé de manière très régulière en post greffe. Ce suivi permet une adaptation très rapide des posologies pour obtenir les valeurs de C0 souhaitées.

Par contre, une étude observationnelle menée chez 304 transplantés rénaux (Kuypers *et al.*, 2010) traités par Tac a cependant permis de conclure à un impact délétère de l'allèle *CYP3A5\*1* sur le développement d'une néphrotoxicité histologique du Tac. Dans cette étude, les facteurs de risque indépendants de néphrotoxicité induite par le Tac étaient : le génotype *CYP3A5\*1/-* (hazard ratio: 2,38; intervalle de confiance à 95%: 1,15-4,92), la posologie de Tac (hazard ratio: 2,06; intervalle de confiance à 95% : 1,30-3,27) et la poursuite de la corticothérapie (hazard ratio: 4,75; intervalle de confiance à 95%: 1,13-19,98).

Une autre étude réalisée chez des transplantés rénaux d'origine Asiatique a évalué la progression de la fibrose interstitielle, entre la biopsie pré-implantatoire effectuée à J0 et une biopsie systématique réalisée 1 an après greffe, par une technique de quantification de la fibrose par une analyse numérique de la biopsie. Dans cette étude, il apparaît que les receveurs *CYP3A5\*3/\*3* développent une fibrose interstitielle plus importante que les patients porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5\*1*. Il faut remarquer que dans cette étude peu de précisions sont données sur les posologies, cependant les C0 de Tac sont particulièrement élevés dans le groupe des patients *CYP3A5* déficitaires (y compris après un an de greffe). Ainsi, les patients porteur d'un allèle *CYP3A5\*1*, avec des C0 plus bas,

paraissent moins exposés au Tac ; ce qui les protège probablement des phénomènes de néphrotoxicité et de progression de la fibrose (Miura *et al.*, 2011).

**Effets de l'allèle *CYP3A5\*6* et *CYP3A5\*7*:** Deux autres polymorphismes *CYP3A5\*6* et *CYP3A5\*7*, rares chez les sujets d'origine Caucasienne, sont relativement fréquents chez les sujets d'origine Africaine (respectivement 17% et 8% (Roy *et al.*, 2005)). Ces deux allèles entraînent l'expression d'une protéine non fonctionnelle (*CYP3A5\*6* est responsable d'un défaut d'épissage, *CYP3A5\*7* engendre un codon stop (Kuehl *et al.*, 2001; Wallemacq *et al.*, 2009; Hustert *et al.*, 2004). Ainsi, chez les receveurs *CYP3A5\*1*, la présence de l'un des allèles \*6 ou \*7 conduit finalement à une protéine non fonctionnelle, et à un phénotype *CYP3A5* déficitaire. En pratique, peu de travaux rapportent l'intérêt du génotypage des allèles \*6 et \*7 dans l'approche pharmacogénétique du Tac. L'intérêt de ces génotypages est probablement assez restreint lorsque l'on s'intéresse à des cohortes de patients Nord-Européens. Dans un travail réalisé en Belgique, Haufroid *et al* (2006), ne rapporte un effet cliniquement significatif de l'allèle \*6 sur l'exposition au Tac que pour un seul patient sur 19.

### 3-1-2-2/ Impact des polymorphismes génétiques du *CYP3A4*

La littérature rapporte principalement des travaux sur l'influence de deux SNP du *CYP3A4* sur l'exposition au Tac : *CYP3A4\*1B* (rs2740574) et, plus récemment du *CYP3A4\*22* (rs35599367).

**Effet de l'allèle *CYP3A4\*1B*:** Il n'est pas certain que ce polymorphisme ait directement un impact sur l'exposition au Tac. En effet, les travaux menés, avec des analyses statistiques multivariées (modèle incluant des SNP des *CYP3A5* et *ABCB1*), n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet indépendant de *CYP3A4\*1B* sur l'exposition au Tac. Son effet, décrit lors des analyses statistiques univariées, pourrait être la conséquence d'une liaison génétique à l'allèle *CYP3A5\*1*. (Hesselink *et al.*, 2008; Staatz *et al.*, 2010).

**Effet de l'allèle *CYP3A4\*22*:** Les patients porteurs d'au moins un allèle T nécessitent des doses moindres (en moyenne -33%) de Tac pour atteindre le niveau souhaité d'exposition au



Tac. Cet effet est encore plus sensible lorsque le polymorphisme *CYP3A5*\*3 est pris en considération : les receveurs homozygotes CC *CYP3A4*\*22 et porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5*\*1 peuvent être considérés comme métabolisant le Tac de manière extensive (Elens *et al.*, 2011a). Une telle analyse combinée permet une meilleure prédiction du rapport C0/dose et explique 60% de la variabilité des posologies de Tac (Elens *et al.*, 2011b).

### 3-1-2-3/ Impact des polymorphismes *ABCB1* 3435C>T, 1236C>T et 2677G>T/A.

La majorité des études (20 sont répertoriées par Staatz *et al.* (2010)) n'ont pu associer le SNP 3435C>T à une variabilité de la pharmacocinétique du Tac. A l'inverse, 6 études sont contradictoires et rapportent une augmentation du rapport C0/dose chez les receveurs homozygotes TT vs CC (Staatz *et al.*, 2010). Par exemple, Hesselink *et al.* (2008) notent une augmentation de 23% du rapport C0/dose et une diminution des posologies de 19% chez les patients homozygotes TT vs CC. De telles conclusions seraient en faveur d'un impact fonctionnel de ce variant sur la Pg-P en limitant ses capacités fonctionnelles.

Il en est de même pour les variations de séquence 1236 C>T et 2677 G>T/A. La plupart des études ne montrent aucun impact significatif de ces SNP sur la pharmacocinétique du Tac (Staatz *et al.*, 2010). Cependant, quelques-unes observent un effet significatif sur les rapports C0/dose qui deviennent plus élevés chez les patients porteurs d'un allèle muté à l'état homozygote. (Anglicheau *et al.*, 2003, Fredericks *et al.*, 2006).

Plutôt qu'une analyse de l'effet individuel de chacun de ces SNP, il apparaît intéressant, de faire une analyse combinée en étudiant l'haplotype regroupant ces 3 allèles. Là encore, les résultats de la littérature sont divergents. Staatz *et al.* (2010) répertorient 6 études qui n'observent aucun impact de l'effet combiné des ces 3 variants. Au contraire, Fredericks *et al.* (2006) décrivent une augmentation du rapport C0/dose des patients porteurs du variant haplotypique *ABCB1* 3435T- 2677T-1236T. Cependant, cet effet disparaît si l'on prend en compte l'effet de l'allèle *CYP3A5*\*3. En transplantation pulmonaire, Wang *et al.* (2006a) ont cherché à évaluer l'influence de cet haplotype chez des receveurs *CYP3A5*\*3/\*3 (afin

d'éliminer l'effet confondant du polymorphisme génétique de *CYP3A5*). Dans cette sous population, les patients porteurs de l'haplotype *ABCB1 3435T- 2677T-1236T* ont des rapports C0/dose plus élevés.

Si l'impact des différents polymorphismes d'*ABCB1* sur la biodisponibilité du Tac reste débattu dans la littérature, il convient toutefois de remarquer qu'aucun travail n'a pu mettre en évidence d'effet sur la survenue d'événements cliniques après greffe.

Au delà de l'influence de ces polymorphismes sur la biodisponibilité du Tac, Capron *et al.* (2010) ont analysé leur impact sur la concentration intra-lymphocytaire de Tac. Les receveurs ayant une mutation *ABCB1 1199 G>A, 3435 C>T, 2677 G>T/A* ont des concentrations intra-lymphocytaires de Tac plus élevées. Cela pourrait influencer l'effet immunosuppresseur de la molécule.

### **3-1-3/ Déterminants non génétique de l'exposition au Tac.**

Même si des progrès dans l'identification de nouveaux polymorphismes des gènes codant pour les protéines responsables de la prise en charge du Tac parvenaient à mieux expliquer la variabilité interindividuelle du rapport entre posologie et exposition aux ACN, il apparaît illusoire d'expliquer l'intégralité de cette variabilité par les seuls déterminants génétiques. En effet, indépendamment du patrimoine génétique du receveur, de nombreux éléments de l'environnement peuvent influencer la pharmacocinétique et l'exposition au Tac.

- Les troubles du transit digestif et les diarrhées entraînent une diminution de l'activité de la Pg-P des cellules intestinales et augmentent fortement la biodisponibilité du Tac (Lemahieu *et al.*, 2005)
- De nombreux médicaments et substances exogènes peuvent induire ou inhiber le CYP3A4 (<http://www.afssaps.fr>), et être ainsi responsables de modification importante de l'exposition au Tac. A titre d'exemple, on peut citer l'interférence avec les dérivés azolés. Ainsi, l'impact de l'inhibition du CYP3A4 par le kétoconazole a été évalué dans un essai prospectif visant à réduire les posologies et le coût économique d'un traitement par Tac

par l'utilisation conjointe de kétoconazole (El-Dahshan *et al.*, 2006). Sous kétoconazole, il est en effet possible de réduire de 54% les posologies de Tac, tout en conservant une cible thérapeutique identique. L'expression systémique de la Pg-P peut également être modifiée par de très nombreux médicaments tels par exemple le vérapamil, le kétoconazole ou l'érythromycine qui sont des inhibiteurs de la Pg-P ([http://www.pharmacomedicale.org/Fiche\\_89.html](http://www.pharmacomedicale.org/Fiche_89.html)).

Les stéroïdes également sont des agents connus pour diminuer la biodisponibilité du Tac (Velickovic-Radovanovic *et al.*, 2010, Ferraris *et al.*, 2011).

Enfin, il faut rappeler que tous ces éléments vont être variables au cours du temps dans le parcours clinique du patient transplanté : les interactions médicamenteuses, les troubles du transit (de même que l'hypoalbuminémie ou les variations de l'hématocrite (*cf supra*)) sont autant d'éléments extrêmement fluctuants susceptibles de modifier la biodisponibilité du Tac.

### **3-2/ Exposition des cellules rénales au Tac.**

La néphrotoxicité est conditionnée par la capacité des cellules rénales à prendre en charge le Tac et à se défendre de l'agression de cette molécule. L'expression de la Pg-P et du CYP3A5 par le tissu rénal joue un rôle majeur dans cette fonction de protection. Là encore, des déterminants génétiques et environnementaux sont à l'origine d'une variabilité d'expression des protéines de prise en charge du Tac par le tissu rénal. En ce qui concerne la variabilité d'origine génétique, s'agissant du tissu rénal greffé, celle-ci est portée par le patrimoine génétique du donneur.

#### **3-2-1/ Expression tissulaire rénale de la Pg-P.**

##### **3-2-1-1/ Expression tissulaire rénale de Pg-P et toxicité des ACN.**

La Pg-P est exprimée au pôle apical des cellules tubulaires et permet l'efflux des ACN en dehors du cytoplasme des cellules tubulaires.

**Sous CsA**, des travaux ont démontré l'importance de la Pg-P dans la protection à l'encontre des phénomènes de néphrotoxicité. Del Moral R *et al.* (1997) ont observé, en utilisant un

modèle de rat soumis à de la CsA à 25 mg/kg/j, que l'exposition à la CsA entraînait une surexpression par les cellules tubulaires rénales de la Pg-P. Dans cette étude, une corrélation inverse entre l'expression de la Pg-P (par Western Blot et immunohistochimie) et la sévérité des lésions histologiques de néphrotoxicité des ACN est observée. Joy *et al.* (2005) ont également constaté une diminution de l'expression de la Pg-P chez des patients transplantés rénaux qui avaient développé des signes histologiques de néphrotoxicité des ACN *versus* les patients qui en étaient indemnes.

Cependant ces observations d'une relation inverse entre l'expression rénale de Pg-P et le développement d'une toxicité tissulaire des ACN (ici surtout la CsA) ne permettent pas de démontrer un lien physiopathologique direct. Enfin, chez des souris dont le gène *ABCB1* a été invalidé et exposées à de la CsA, la concentration intra-rénale de CsA est similaire à celle des animaux de génotype *ABCB1* sauvage (alors que la concentration intra cérébrale est 17 fois supérieure chez la souris *ABCB1*<sup>-/-</sup> vs souris sauvage) (Schinkel *et al.*, 1995).

**Pour le Tac**, peu de données expérimentales sont accessibles et la question reste débattue. En effet, Metalidis *et al.* (2001) ont observé dans une étude rétrospective (analyse par immunohistochimie de l'expression de la Pg-P sur des biopsies de 32 patients ayant développé une néphrotoxicité histologique du Tac *versus* 50 patients avec des biopsies protocolaires normales et 21 patients avec des signes histologiques de rejets) que l'expression tubulaire de Pg-P était indépendante de l'apparition d'une néphrotoxicité induite par le Tac.

### 3-2-1-2/ Effets des polymorphismes génétiques de *ABCB1* portés par le donneur.

Plusieurs travaux ont évalué l'impact de mutations de *ABCB1* potentiellement connues pour entraîner des modifications de l'expression de la Pg-P. Il convient de distinguer l'effet de ces polymorphismes génétiques lors de l'utilisation de la CsA et du Tac.

- Influence du polymorphisme génétique de *ABCB1* du donneur lors d'un traitement par CsA.

Une première étude (Hauser *et al.*, 2005) a comparé le génotype *ABCB1* de 18 patients ayant développé une néphrotoxicité de la CsA, et 79 patients pour lesquels les critères de néphrotoxicité n'étaient pas atteints. On remarquera que, dans cette étude, les patients qui évoluent vers le diagnostic de néphrotoxicité le font relativement rapidement (en moyenne un an après la greffe). En analyse multivariée, seul le génotype *ABCB1 3435TT* du donneur est associé de manière indépendante à la survenue d'une néphrotoxicité induite par la CsA (Odds ratio : 13,4; intervalle de confiance à 95% : 1,2-148 P = 0,034).

Dans une série rétrospective, Woillard *et al.* (2010) ont analysé l'impact du polymorphisme génétique d'*ABCB1* du donneur sur la survie du greffon rénal d'une cohorte de 259 patients suivis en moyenne 72 mois. La survie des greffons rénaux issus de donneurs porteurs de l'haplotype *ABCB1 3435T-2677T-1236T* est significativement moindre. A l'état hétérozygote, le risque relatif de perte du greffon associé à cet haplotype du donneur est de 3,32 (NS), et de 9,34 à l'état homozygote (Intervalle de confiance à 95%: 2,3–38,4 ; p= 0.0019). L'analyse de l'effet d'un haplotype regroupant 3 mutations affectant *ABCB1* semble donc une approche très pertinente.

➤ Influence du polymorphisme génétique de *ABCB1* du donneur lors d'un traitement par Tac.

Dans un travail mené chez 252 transplantés, traités par Tac, ayant bénéficié de 744 biopsies de greffons (réalisées sur les 3 premières années de greffe), Naesens *et al.* (2009a) ont pu démontrer que (i) l'absence d'expression de la Pg-P au pôle apical des cellules tubulaires épithéliales (technique d'immunomarquage) ; et (ii) l'homozygotie combinée du donneur et du receveur *ABCB1 3435TT* étaient associées à une augmentation des index histologiques d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle (FI/AT). Cependant, l'effet combiné de l'homozygotie TT du donneur et du receveur ne modifie pas la survie du greffon rénal. Enfin, il n'existait aucune association entre l'expression tubulaire (immunohistochimie) de la Pg-P et le développement de lésions vasculaires (lésions de hyalinose artériolaire) de néphrotoxicité des ACN. La relation qui associe les SNP *ABCB1 3435 C>T* du couple

donneur/receveur avec les phénomènes de toxicité rénale ne semble donc affecter que le compartiment tubulo-interstitiel. Cela est compatible avec le profil d'expression tubulaire de la Pg-P sous la dépendance du patrimoine génétique du donneur. Cependant, dans une telle hypothèse l'implication du patrimoine génétique du receveur reste moins bien comprise.

### 3-2-1-3/ Effets de l'environnement sur l'expression tissulaire rénale de la Pg-P.

L'Évérolimus et le Sirolimus (tous deux inhibiteurs de mTOR) sont des inhibiteurs connus de la Pg-P. Ainsi, lorsqu'ils sont associés à un ACN, ils augmentent (dans un modèle de culture primaire de cellules tubulaires rénales) la concentration intra-cellulaire d'ACN ; ce qui pourrait, *in vivo*, majorer le risque de toxicité des ACN (Anglicheau *et al.*, 2006). Chez le rat, cet effet a été particulièrement bien démontré par Podder *et al.* (2001). Les auteurs ont observé une très importante augmentation des concentrations tissulaires intrarénales de CsA lorsque que des rats étaient traités de manière concomitantes par de la CsA et du Sirolimus. Comparée à une monothérapie de chacun de ces immunosuppresseurs, cette association provoque la dégradation rénale la plus importante, et les lésions de néphrotoxicité les plus sévères. Cet effet explique probablement la dégradation de la fonction rénale qui est observée en clinique humaine dans des schémas associant inhibiteurs de mTOR et ACN (Ciancio *et al.*, 2006). Une étude observationnelle récente comparant les effets à long terme d'une stratégie d'association Mycophénolate/Tac à une association Sirolimus/Tac confirme ces données avec une moins bonne survie du greffon rénal lors de l'association Sirolimus/Tac (Chhabra *et al.*, 2012).

### **3-2-2/ Expression rénale du CYP3A5.**

Les données dans la littérature sont moins nombreuses. Sous CsA, les polymorphismes *CYP3A5\*1* et *CYP3A4\*1B* du donneur n'influencent pas la survie ou la fonction du greffon rénal (Woillard *et al.*, 2010). Dans l'étude de Naesens *et al.*, (2009a) il en est de même sous traitement par Tac.

Metavidis *et al.* (2011) ont analysé l'expression tissulaire rénale du CYP3A5 (par immunohistochimie) chez des transplantés rénaux sous Tac. Ils observent une expression membranaire du CYP3A5 au pôle apical des tubules proximaux sur 47% des biopsies présentant des signes de néphrotoxicité du Tac (*versus* 14% des biopsies dépourvues de toxicité,  $p < 0,01$ ). Par contre, l'expression du CYP3A5 au pôle apical des tubules distaux diminue en cas de néphrotoxicité avérée. L'implication physiopathologique de ces modifications d'expression demeure indéterminée. Dans cette étude, il n'existe pas d'association entre le génotype *CYP3A5* 6986A>G du donneur et le développement de lésions histologiques de néphrotoxicité du Tac.

### **3-3/ Déterminants de la vulnérabilité aux phénomènes de fibrose.**

Concernant un phénomène tissulaire local tel que la fibrose interstitielle du rein greffé, il apparaît intéressant de se rapporter au patrimoine génétique du donneur. Peu d'études ont évalué l'impact de différents polymorphismes génétiques du donneur sur le développement de la fibrose et/ou sur la perte de fonction du greffon.

#### **3-3-1/ Polymorphisme génétique de *APOL1*.**

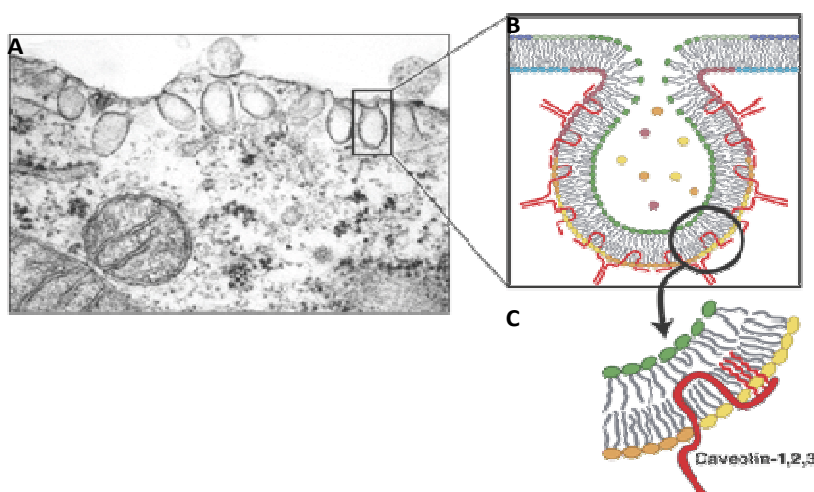
En pathologie rénale, en dehors de la transplantation rénale, des polymorphismes génétiques affectant *MYH9* (non-muscle MYosin Heavy chain 9) et *APOL1* (Apolipoprotein L1) ont été associés au développement de lésions rénales vasculaires de type néphro-angiosclérose chez des patients Afro-Américains. Il est en fait très probable que le polymorphisme génétique initialement décrit sur *MYH9* ne soit qu'une conséquence d'un déséquilibre de liaison avec ceux décrits sur *APOL1* (Tzur *et al.*, 2010). Une association très forte est maintenant démontrée entre le fait d'être porteur de deux variants affectant *APOL1* (allèles G1 et G2) et le développement de lésions vasculaires rénales de type néphro-angiosclérose (Odd's Ratio 7,3) (Genovese *et al.*, 2010). Néanmoins, ce polymorphisme génétique n'est actuellement pas décrit dans la population caucasienne.

L'impact du polymorphisme génétique de *APOL1* sur la perte de greffon a été évalué dans une étude rétrospective réalisée chez 136 donneurs Afro-Américains (Reeves-Daniel *et al.*, 2011). Lorsque le donneur était porteur des 2 allèles G1 et G2 du gène *APOL1*, le risque relatif de perte du greffon était de 3,84 (indépendamment de tout autre facteur de risque de perte du greffon). Aucune donnée histologique n'était rapportée dans ce travail, il est donc impossible d'observer si l'effet de ces polymorphismes portait purement sur des lésions vasculaires ou affectait également le compartiment tubulo-interstitiel.

### 3-3-2/ Polymorphisme génétique de *CAV1*.

#### 3-3-2-1/ Cavéoles et cavéoline-1.

Les Cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique, riches en cholestérol et en sphingolipides, dont le diamètre est compris entre 50 et 70 nm (**Figure 8**). Elles sont actuellement considérées comme des radeaux lipidiques spécialisés, morphologiquement caractérisés par leur forme invaginée et par la présence de 3 protéines de structure appelées cavéolines (cavéoline-1 (CAV-1), cavéoline-2 et cavéoline-3). Elles sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques, notamment l'endocytose, la signalisation cellulaire, et la transcytose de macromolécules (cholestérol, albumine...) (Chidlow *et al.*, 2010).



**Figure 8 : Structure des Cavéoles.** A. Structure des cavéoles en microscopie électronique à transmission. B. Structure schématique des cavéoles. C. Insertion des cavéolines dans la membrane au sein des cavéoles (Thomas, 2008).



CAV-1 contient un domaine qui permet l'oligomérisation de 14 à 16 molécules (Sargiacomo *et al.*, 1995). Ces oligomères de CAV-1 se regroupent ensuite et s'organisent en complexes qui atteignent 350 à 400 kDa. Sur ces complexes viennent s'amarrer différentes protéines qui entrent en interaction avec les cavéoles.

L'ancrage aux différentes protéines membranaires se fait *via* un domaine spécifique dit « scaffolding domain » (CSD). Ce CSD a un rôle double : il sert d'ancrage à plusieurs protéines à l'intérieur des cavéoles et de régulateur pouvant soit inhiber, soit activer les protéines avec lesquelles il interagit. Ainsi par interaction avec le CSD, de très nombreuses protéines se trouvent co-localisées dans les cavéoles notamment des molécules impliquées dans des fonctions de signalisation telles que : des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) (EGFR, PDGFR, IGFR), des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) (récepteur adrénergiques, récepteur muscarinique), des molécules impliquées dans la signalisation calcique (canaux calciques de type L, calcium ATPase, canaux Transient Receptor Potential Canonical (TRPC), des molécules adaptatrices (Phosphatidyl inositol diphosphate (PIP<sub>2</sub>), E-cadhérine, des protéines G hétérotrimériques), des enzymes (tyrosines kinases de la famille src, ser/thr kinases dont des Protéines Kinases C (PKC), GTPases, l'adénylate cyclase, la eNOS, des phospholipases), des protéines structurales (SNARE, VAMP-2, dynamine) (Razani *et al.* 2002). D'autres travaux ont démontrés l'interaction de CAV-1 avec la voie de signalisation moléculaire du TGF- $\beta$  (Del Galdo *et al.*, 2008a ; Del Galdo *et al.*, 2008b ; Lee *et al.*, 2007). Il a été démontré que CAV-1 inhibe la phosphorylation de SMAD2, un facteur de transcription impliqué dans la transcription du gène du TGF $\beta$  (Lee E *et al.*, 2007). De plus, CAV-1 module la réponse au TGF $\beta$  par une régulation de ses récepteurs (T $\beta$ Rs) en participant à leur internalisation (Del Galdo *et al.*, 2008a)

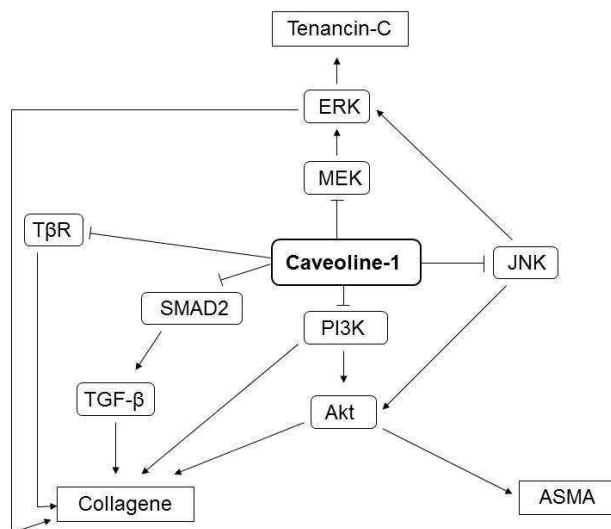
Par ses multiples interactions protéiques, CAV-1 est donc au centre de différents processus de signalisation cellulaire et peut être considérée comme une plateforme d'intégration de différents signaux de croissance ou de différenciation cellulaire.

### 3-3-2-2/ Implication de CAV-1 dans différentes pathologies fibrosantes.

Plusieurs travaux soulignent l'implication de CAV-1 dans les processus inflammatoires et fibrosants. Ces phénomènes sont observés de manière ubiquitaire dans différents tissus.

Dans un modèle murin de maladie intestinale inflammatoire, la perte de l'expression de CAV-1 par les cellules endothéliales réduit les phénomènes d'angiogénèse associés à la pathologie inflammatoire. (Chidlow *et al.*, 2009).

Dans un modèle murin de pathologie pulmonaire avec réponse inflammatoire, l'expression de CAV-1 par les polynucléaires neutrophiles joue un rôle clef dans leurs capacités d'activation, d'adhésion puis finalement de migration trans-endothéliale (Hu *et al.*, 2008). Au stade plus tardif de constitution des lésions de fibrose, il a pu être observé une diminution de l'expression de CAV-1 dans le parenchyme pulmonaire de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Wang *et al.*, 2006). Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par injection intra trachéale de bléomycine, l'instillation d'un adénovirus codant pour le gène *CAV1* induit une diminution des lésions fibreuses (Tourkina *et al.*, 2008). Enfin, la diminution de l'expression de CAV-1 par des fibroblastes maintenus en culture et exposés à du TGF $\beta$  induit une augmentation de synthèse de matrice extracellulaire (par blocage de la voie c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Wang *et al.*, 2006b). L'implication de CAV-1 dans des processus anti-fibrotiques au niveau pulmonaire a également été rapportée dans des systèmes de cultures primaires de fibroblastes pulmonaires humains, ainsi que dans des tissus fibrosés murins et humains (Tourkina *et al.*, 2005, Tourkina *et al.*, 2008). Ces travaux montrent que CAV-1 participe à l'inhibition de l'expression du collagène, de la tenacin-C et de l'actine du muscle lisse (ASMA) *via* l'inhibition directe ou indirecte de facteurs de transcription tels que MEK/ERK, JNK ou Akt (**Figure 9**) (Tourkina *et al.*, 2005).



**Figure 9 : Mécanismes à l'origine des propriétés antifibrotiques de la cavéoline-1** (d'après Tourkina *et al.*, 2005)

Dans le parenchyme rénal, CAV-1 est exprimée par les cellules mésangiales, les cellules tubulaires proximales et les cellules de la capsule de Bowman (Moriyama *et al.*, 2011). Par ailleurs, des travaux rapportent l'implication de CAV-1 en pathologie rénale. Dans un modèle d'obstruction rénale unilatérale transitoire, les souris invalidées pour le gène *CAV1* développent des lésions fibreuses interstitielles plus sévères que les souris sauvages ou que des souris surexprimant *CAV-1* (Park *et al.*, 2010). En clinique humaine, très peu de données sont disponibles : dans une série rapportant 19 enfants porteurs d'un syndrome de jonction pyélo-urétéral, il apparaît que l'expression tissulaire de *CAV1* est associée à la sévérité des lésions fibreuses (Vallés *et al.*, 2007). Indépendamment de son impact sur la fibrose, *CAV-1* semble impliquée dans les processus d'internalisation intra-cellulaire du BK-Virus, et en ce sens participerait à la physiopathogénie de la néphropathie à polyomavirus après transplantation rénale (Moriyama *et al.*, 2008).

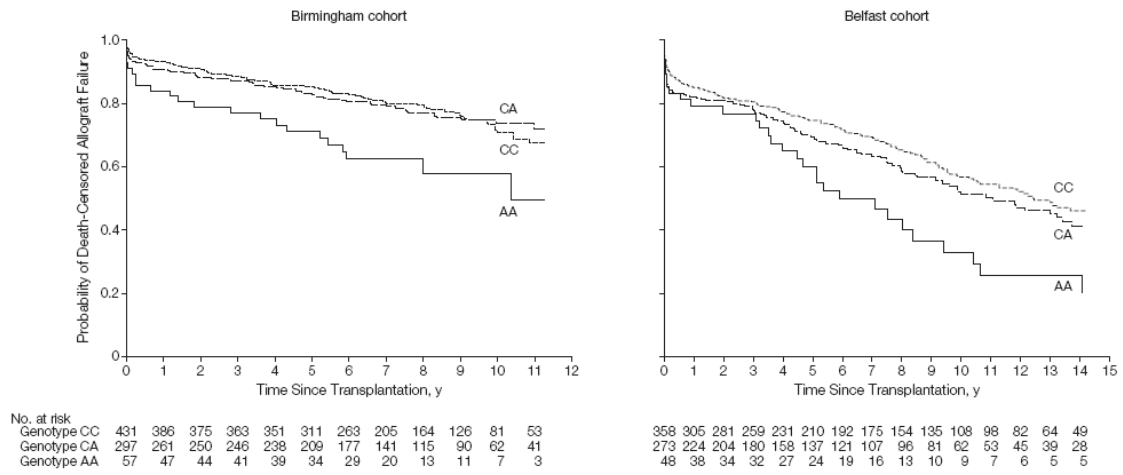
Ainsi, *CAV-1* exerce des effets protecteurs vis-à-vis du développement des lésions fibreuses. Dès lors, il apparaît légitime de s'interroger sur les différents facteurs qui pourraient moduler son expression tissulaire et qui, en fonction de sa capacité à exprimer *CAV1*, rendrait ainsi

un tissu plus ou moins vulnérable au développement de lésions fibreuses après une agression pathologique.

### 3-3-2-3/ Polymorphisme génétique de CAV1, fibrose et perte du greffon rénal.

Moore *et al.* (2010) ont testé l'effet de 12 SNP du gène *CAV1* sur le devenir du greffon. Dans ce travail, les auteurs soulignent le fait que la transplantation rénale puisse correspondre à un modèle clinique de fibrose rénale « accélérée », conséquence des multiples agressions. Cette étude, réalisée sur les ADN génomiques des donneurs de 785 transplantés rénaux (« Birmingham cohort »), montre que les patients dont le greffon est de génotype AA pour le SNP rs4730751 (C>A, variant intronique situé entre l'exon 2 et 3) présentent un risque accru de perte du greffon (à 12 ans post-greffe : 38,6% pour les génotypes AA vs 22,3% pour les génotypes AC vs 22,2% pour les génotypes CC). Ces résultats ont été validés par les auteurs sur une cohorte indépendante de réplication (« Belfast cohort ») incluant 679 patients transplantés rénaux (**Figure 10**). En analyse multivariée le génotype *CAV1* du donneur est le déterminant statistiquement le plus important de perte du greffon rénal (Hazard ratio : 1,97, IC : 1,23-3,16, p=0.002). Les autres variants testés du gène *CAV1* ne semblent pas être associés de manière significative à l'évolution de la greffe rénale.

Dans ce travail, peu de renseignements cliniques sont donnés sur l'immunosuppression. Il apparaît probable que le traitement immunosuppresseur ne soit pas homogène entre les différents patients (28% des patients provenant de la cohorte de Belfast ne sont exposés à aucun traitement par ACN). On ne peut donc exclure que seul un sous groupe de patients exposés à une immunosuppression particulière soit plus ou moins enclin à développer des lésions fibreuses. Par ailleurs, aucune étude de corrélation entre l'analyse histologique systématique du greffon rénal et le génotype *CAV1* n'est proposée.



**Figure 10 : Association entre le SNP rs4730751 affectant le gène *CAV1* des donneurs et la survie actuarielle des greffons rénaux (censurée pour le décès) dans deux cohortes de patients transplantés rénaux (Moore *et al.*, 2010).**

## **Avant propos :**

Objectif global du projet de recherche.

De par ses fonctions et sa physiologie, le rein est un organe particulièrement exposé à l'agression toxique par les xénobiotiques de toutes origines (médicaments, polluants industriels, toxiques environnementaux). Ces phénomènes de néphrotoxicité peuvent altérer la structure et la fonction du parenchyme rénal, et être à l'origine d'une perte de fonction rénale. A l'échelle cellulaire, des systèmes enzymatiques et des transporteurs permettent aux différents tissus de prendre en charge les xénobiotiques, et dans la plupart des cas d'en diminuer la toxicité potentielle.

Les inhibiteurs de la calcineurine ou anti-calcineurines (ACN), dont font partie la Ciclosporine (CsA) et le Tacrolimus (Tac) sont des traitements pivots en transplantation rénale. En prévenant la survenue de rejets aigus, ces thérapeutiques ont permis une nette amélioration du pronostic à court terme de la greffe rénale. Néanmoins, ces traitements sont néphrotoxiques, et leur administration au long cours contribue à altérer la fonction du greffon rénal. Cet effet « paradoxal » constitue une limite majeure à leur utilisation. Ces phénomènes de toxicité chronique sont histologiquement corrélés à des lésions vasculaires de hyalinose artériolaire, d'atrophie tubulaire, de fibrose interstitielle « en bandes » et d'une glomérulosclérose. S'il est globalement admis qu'à long terme, tous les patients développeront des stigmates histologiques de toxicité des anti-calcineurines, il n'en demeure pas moins que la sévérité et la précocité de ces lésions sont variables selon les individus.

Dès lors, il importe d'améliorer la compréhension des phénomènes de susceptibilité individuelle à la toxicité au Tac. L'identification de tels facteurs de susceptibilité individuelle ouvre des champs de connaissances en matière de médecine personnalisée appliquée à la transplantation. Au-delà de la transplantation rénale, la néphrotoxicité du Tac peut s'apparenter à un modèle clinique d'agression néphrotoxique chronique conduisant au développement de lésions fibreuses rénales. Une telle problématique dépasse le domaine de la greffe rénale pour s'appliquer à celui des agressions rénales par des xénobiotiques.

Le Tac, comme tous les composés exogènes de l'organisme, est pris en charge, principalement au niveau hépatique mais aussi intestinal et rénal, par des transporteurs et des systèmes enzymatiques capables de réaliser un large spectre de réactions chimiques et de désactiver un grand nombre de xénobiotiques. Parmi ces systèmes, des enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (P450 ou CYP), membres de la sous-famille CYP3A, les CYP3A4 et 3A5, sont majoritairement impliqués. L'efflux du Tac hors du cytoplasme est quant à lui essentiellement assuré par des protéines de transports notamment par la glycoprotéine-P (Pg-P), codée par le gène *ABCB1*.

Les gènes codants pour ces différentes protéines sont polymorphes. Ce phénomène peut conduire à une variabilité interindividuelle de l'expression et/ou de la fonction des protéines codées par ces gènes. Des polymorphismes affectant le patrimoine génétique du receveur peuvent ainsi modifier la biodisponibilité et la pharmacocinétique du Tac, et être à l'origine d'une importante variabilité interindividuelle d'exposition au produit. Une première hypothèse, pour expliquer la sensibilité individuelle aux phénomènes de toxicité induits par le Tac, repose sur cette notion de variabilité interindividuelle d'exposition associée aux polymorphismes génétiques des *CYP3A4*, *CYP3A5* et *ABCB1* portés par les gènes du receveur. Une deuxième hypothèse (non exclusive de la première) concerne l'implication du patrimoine génétique du donneur. En effet, les différentes protéines de biotransformation et de transport des xénobiotiques contribuent à prendre en charge le Tac et ses métabolites au niveau du parenchyme rénal. Dans le greffon rénal, ces systèmes pourraient protéger le rein de l'agression toxique du Tac. Il apparaît donc nécessaire d'étudier les polymorphismes des gènes codants ces différentes protéines et d'analyser leur influence sur les phénomènes de néphrotoxicité induits par le Tac. Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons analysé le devenir d'une cohorte de patients transplantés rénaux traités par Tac (Prograf®), en fonction des génotypes *CYP3A5* et *ABCB1* du donneur et du receveur.

Le Tac est actuellement disponible dans une version galénique permettant l'administration d'une dose unique quotidienne (Advagraf®). Compte tenu des particularités



pharmacocinétiques de cette présentation, il est nécessaire de réévaluer l'impact du polymorphisme génétique du *CYP3A5* du receveur sur les paramètres d'exposition au Tac. Ainsi, une étude prospective de conversion du Prograf® vers l'Advagraf® a été réalisée de manière à analyser les modifications d'exposition au Tac en fonction du génotype *CYP3A5*.

Par ailleurs, l'expression des systèmes de défense que sont les enzymes de métabolisme et de transport des xénobiotiques (EMTX) par le parenchyme rénal reste très méconnue. Ces systèmes ne se limitent pas en l'expression de *CYP3A4*, *CYP3A5*, Pg-P. D'un point de vue plus fondamental une meilleure connaissance de l'expression des systèmes de défense, et de leur variation interindividuelle permettrait de mieux appréhender les phénomènes de susceptibilité individuelle à la toxicité rénale des médicaments et des xénobiotiques en général. Ainsi, nous avons analysé par une technique de PCR en temps réel l'expression de 380 gènes impliqués dans la prise en charge des xénobiotiques dans le tissu rénal sain humain, puis avons évalué si l'expression de ces gènes était variable ou non entre les individus. Par ailleurs, afin de disposer d'un modèle *in vitro* permettant de tester la toxicité rénale de différents médicaments et xénobiotiques dans des conditions les plus proches de celles obtenues *in vivo*, l'expression des 380 EMTX dans des tissus rénaux sains et dans différentes lignées et cultures primaires de cellules épithéliales a été comparée.

La vulnérabilité à l'agression néphrotoxique peut également dépendre de la variabilité des mécanismes impliqués dans le développement de lésions fibreuses. Par exemple, la Cavéoline-1 (CAV-1) est une protéine anti-fibrosante, codée par le gène *CAV1*. Un polymorphisme génétique affectant *CAV1* (rs4730751) porté par l'ADN du donneur a été récemment associé à une moins bonne survie du greffon rénal. Nous avons évalué, parmi une cohorte de transplantés rénaux traités de manière homogène par Tac, l'impact de ce polymorphisme génétique de *CAV1* du donneur sur la fonction du greffon rénal et sur l'histologie du greffon.

L'objectif global de ce travail est donc de préciser les déterminants de la toxicité du Tac, notamment de déterminer l'influence respective de la variabilité interindividuelle d'expression des système de défense et des polymorphismes génétiques (des donneurs et des receveurs) affectant les gènes codant pour des enzymes de prise en charge des xénobiotiques (*CYP3A5* et *ABCB1*), et de la variabilité d'un système impliqué de manière aspécifique dans la protection contre la fibrose (*CAV1*).

## Partie 2 : Travaux

## **1/ Impact du polymorphisme génétique du CYP3A5 sur la pharmacocinétique du Tac en monoprise (Advagraf®) en transplantation rénale.**

Le Tac est maintenant disponible dans une formulation galénique qui autorise une seule prise quotidienne (Advagraf®). Cette nouvelle présentation s'apparente à une forme à libération prolongée. Les études ayant permis l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché ([www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-4886\\_advagraf\\_.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-4886_advagraf_.pdf)) pour ce produit ont montré que, par comparaison à l'administration de Prograf® (0,2 mg/kg/j), chez des transplantés *de novo*, l'aire sous la courbe du Tac est plus basse de 20 à 30% à J1 après transplantation rénale chez les patients traités par Advagraf®. Les AUC et les C0 de Tac sont ensuite comparables entre les 2 formulations à partir de J3. Chez des patients stables traités initialement par le Prograf®, convertis 1/1 vers Advagraf®, l'exposition au Tac (AUC, C0) est comparable entre les deux formulations. Dans 90% des cas, après cette conversion, l'exposition moyenne (mesurée par l'AUC 0-24h) au Tac varie entre -20% à +25%.

Bien que, dans ces études pivotales, les AUC de Tac apparaissent globalement équivalentes entre les deux formulations, la cinétique d'absorption est plus lente et plus prolongée sous Advagraf®. Compte tenu de l'implication du CYP3A5 dans la prise en charge cellulaire du Tac, on peut faire l'hypothèse d'une modification de la pharmacocinétique chez les patients CYP3A5 fonctionnels.

Par ailleurs, des études observationnelles réalisées après mise à disposition de l'Advagraf® ont montré que la conversion à équivalence de dose du Prograf® vers l'Advagraf® conduisait à une diminution significative des C0 (-12±24%,  $p < 0,0001$ ) nécessitant une augmentation des posologies d'Advagraf® chez 52,5% des patients (de Jonge *et al.*, 2010).

Lors de la réalisation de ce travail, il n'existait pas de données concernant l'impact éventuel du polymorphisme de *CYP3A5* sur la pharmacocinétique du Tac dans sa version monoprise (Advagraf®). Dans cette étude prospective, nous avons analysé les variations d'AUC (calcul de l'AUC par technique trapézoïdale, à partir de 17 mesures de concentration de Tac sur 24 heures) de Tac lors du passage du Prograf® à l'Advagraf®, dans 2 groupes de patients transplantés rénaux stables : les receveurs porteurs d'un allèle *CYP3A5\*1* vs les receveurs *CYP3A5\*3/\*3*.

Nous avons ainsi pu montrer qu'après cette conversion, les patients porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5\*1* sont significativement moins exposés au Tac. Pour les patients *CYP3A5\*3/\*3* nous observons également une diminution de l'exposition au Tac, qui n'atteint toutefois pas la significativité statistique. Ces données confirment que la présence de l'allèle *CYP3A5\*1* influence plus fortement le métabolisme et l'exposition au Tac lorsqu'il est administré dans sa forme à libération prolongée (par rapport à une administration en 2 prises quotidiennes).

Sous Advagraf®, il existe une modification de la cinétique d'exposition de la muqueuse digestive au Tac. Dès lors les polymorphismes génétiques affectant *ABCB1* pourraient avoir un effet biologique significatif et influencer la biodisponibilité de l'Advagraf®. Dans la population que nous avons sélectionnée (receveur *CYP3A5\*1/-* vs *CYP3A5\*3/\*3*) nous avons observé un déséquilibre de liaison entre *CYP3A5* et *ABCB1* qui nous a empêché d'analyser l'impact du polymorphisme génétique d'*ABCB1* sur les modifications d'exposition au Tac après conversion. Il serait intéressant d'analyser des variations de C0 (nous avons déjà vérifié que le C0 sous Advagraf® était corrélé à l'AUC 0-24h), après conversion Prograf®/Advagraf®, en fonction du statut *ABCB1* du receveur dans une population non sélectionnée.





















## **2/ Impact des polymorphismes génétiques *CYP3A5* (6986 A>G) et *ABCB1* (3435 C>T) du donneur et du receveur sur l'exposition au Tac, sa néphrotoxicité et le pronostic fonctionnel du greffon rénal.**

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que les SNP *CYP3A5* 6986A>G et *ABCB1* 3435C>T du donneur et du receveur pouvaient influencer les phénomènes de néphrotoxicité et ainsi participer au pronostic fonctionnel du greffon rénal. Dans cette optique, l'étude de ces polymorphismes aiderait à individualiser au mieux l'immunosuppression.

En effet, le polymorphisme *CYP3A5* 6986A>G du receveur modifie l'exposition au Tac et le rapport entre la dose de Tac administrée et la concentration plasmatique. La question est d'évaluer si les posologies plus élevées de Tac qui sont administrées chez les receveurs portant au moins un allèle *CYP3A5*\*1 sont associées à des phénomènes de toxicité plus marqués, et à un pronostic plus défavorable de la greffe rénale.

Par ailleurs, le métabolisme intra-rénal du Tac est sous la dépendance des protéines *CYP3A5* et *ABCB1* exprimées par les cellules du donneur. Les capacités métaboliques rénales des patients sont dépendantes du patrimoine génétique du donneur. Le deuxième objectif de ce travail est donc d'analyser l'impact respectif des polymorphismes de *CYP3A5* et *ABCB1* du donneur et du receveur dans le pronostic fonctionnel du greffon rénal.

Pour cela, nous avons suivi une cohorte de 209 patients transplantés traités par Tac (Prograf®) pendant 21,8±9 mois, et observé les résultats du suivi clinique, biologique et histologique en fonction des génotypes *CYP3A5* 6986A>G et *ABCB1* 3435C>T des donneurs et des receveurs.

Les dosages résiduels de Tac (C0), ainsi que le rapport C0/dose dépendent du statut *CYP3A5* du receveur : les patients porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5*\*1 nécessitent des posologies de Tac plus élevées et présentent malgré tout des C0 plus basses. Cependant

certain patients CYP3A5 « déficitaires » nécessitent également des posologies élevées de Tac alors que leurs C0 restent à des valeurs basses. Cette observation suggère qu'il existe d'autres systèmes enzymatiques polymorphes qui métabolisent le Tac, ou des éléments environnementaux qui modifient l'activité des systèmes prenant en charge le Tac.

Bien que le génotype *CYP3A5* du receveur influence de manière notable l'exposition au Tac, aucun impact de ce génotype dans la survenue d'événements cliniques après greffe n'a été mis en évidence. En effet, les incidences du rejet aigu, du retard de fonctionnement du greffon, et la fonction rénale à 2 ans ne sont affectées par aucun des polymorphismes évalués, aussi bien chez le donneur que le receveur. De même, sur l'ensemble des biopsies réalisées, la fréquence des lésions de néphrotoxicité du Tac apparaît non influencée par les différents génotypes évalués. Cependant, la néphrotoxicité nous a obligé à une interruption du Tac significativement plus fréquente chez les receveurs *CYP3A5* fonctionnels. Enfin, nous avons pu observer que même chez les receveurs porteurs d'un *CYP3A5* fonctionnel, il était possible d'opérer secondairement (dès le troisième mois de greffe) des diminutions de posologies de Tac équivalentes à celles réalisées chez les receveurs *CYP3A5* déficitaires. Il est probable que cette pratique d'épargne en Tac ait limité le développement d'une néphrotoxicité du Tac. Malgré ces réductions de doses, nous n'avons constaté aucune surincidence des rejets aigus chez les receveurs *CYP3A5* fonctionnels.

La question devient dès lors celle des C0 cibles spécifiques à obtenir à moyen-long terme chez les receveurs *CYP3A5* fonctionnels. Actuellement aucune étude interventionnelle randomisée ne répond à cette question.

Une des limites de ce travail réside dans le choix de limiter l'analyse du polymorphisme génétique d'*ABCB1* à un seul SNP. Cependant, les autres polymorphismes de *ABCB1* décrits dans la littérature comme pouvant influencer la biodisponibilité du Tac sont, le plus souvent, en déséquilibre de liaison avec le SNP que nous avons étudié. Par ailleurs, lorsque nous avons débuté ce travail, les données sur l'impact des polymorphismes génétiques du



CYP3A4 étaient assez peu probantes. Depuis la mise en évidence récente de l'effet de l'allèle *CYP3A4\*22* sur la biodisponibilité du Tac, il apparaît intéressant d'évaluer l'impact de ce polymorphisme (dans le patrimoine du receveur et du donneur) sur l'incidence des phénomènes de néphrotoxicité.

Néanmoins, pris dans leur ensemble ces données suggèrent que bien qu'influençant fortement l'exposition au Tac, le polymorphisme *CYP3A5* du receveur n'est pas associé à la survenue d'une néphrotoxicité particulière, sous réserve d'une politique d'épargne en ACN et d'un suivi thérapeutique pharmacologique régulier. Cette absence de sur-incidence évidente de néphrotoxicité, chez des patients *CYP3A5\*1/-* conduit à s'interroger sur d'autres facteurs contribuant à la protection du greffon contre le développement d'une néphrotoxicité. D'autres facteurs de sensibilité au Tac pourraient être évoqués, tel que par exemple la sensibilité individuelle au phénomène de fibrose, ou la prise en charge du Tac par d'autres systèmes enzymatiques polymorphes exprimés par le tissu rénal.























### **3/ Variabilité interindividuelle des capacités rénales à prendre en charge les xénobiotiques : impact potentiel sur les phénomènes de néphrotoxicité.**

#### **Introduction-Position du problème**

Dans la première partie de notre travail (Article 1 et 2), nous n'avons pu observer de lien direct entre des signes de néphrotoxicité du Tac et des polymorphismes génétiques qui influencent pourtant de manière majeure sa prise en charge cellulaire. Dès lors, on peut émettre différentes hypothèses, mutuellement non exclusives, qui pourraient expliquer la susceptibilité individuelle à la toxicité du Tac :

- il existe d'autres polymorphismes génétiques que ceux explorés, ou des mécanismes épigénétiques, qui modifient l'expression tissulaire des systèmes enzymatiques déjà connus pour prendre en charge et métaboliser le Tac (dont les CYP3A5 et ABCB1).
- d'autres systèmes protéiques (en plus des CYP3A5 et ABCB1) interviennent dans la prise en charge cellulaire et dans le métabolisme du Tac. Les variations d'expression tissulaires rénales de ces systèmes pourraient être associées à une vulnérabilité plus ou moins importante à la néphrotoxicité induite par le Tac.
- la toxicité du Tac est dépendante d'autres facteurs de vulnérabilité que ceux directement liés à son transport et/ou son métabolisme.

Dans un premier temps, la variabilité interindividuelle d'expression rénale des systèmes de défense vis-à-vis du Tac (et des xénobiotiques en général) a été évaluée. Cette question dépasse donc largement celle de la néphrotoxicité induite le Tac, et engage de manière plus globale le cadre de la toxicité rénale induite par les xénobiotiques (médicament, polluants environnementaux....).

Des travaux antérieurs menés au sein de l'EA4483 (Leclerc *et al.*, 2011) ont permis de recenser (à partir d'une analyse minutieuse de la littérature et des banques de données disponibles) 380 gènes codants pour des protéines impliquées de manière très ubiquitaire dans la prise en charge des xénobiotiques. Ces 380 gènes codent pour 220 enzymes du métabolisme des xénobiotiques (146 enzymes de phase I, 74 enzymes de phase II), 114 protéines du transport des xénobiotiques (principalement des membres des familles ABC et SLC), et 46 facteurs ou co-facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes précédents). (**Tableau 2**).

Les objectifs de cette analyse étaient donc de :

A/ caractériser les capacités métaboliques du tissu rénal humain normal, en mesurant le niveau d'expression global de 380 gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des xénobiotiques. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé une technologie basée sur le principe de la PCR en temps réel (sur support Taqman Low Density Array ou TLDA) permettant l'analyse simultanée des 380 gènes candidats sélectionnés. Cette stratégie a été appliquée à des échantillons de tissu rénal sain prélevés sur des pièces de néphrectomie pour carcinome rénal.

B/ valider un modèle cellulaire *in vitro* permettant d'appréhender l'impact de l'exposition au Tac et aux xénobiotiques. Afin de déterminer le système cellulaire le plus adéquat, nous avons comparé le profil d'expression des 380 gènes d'intérêt du tissu rénal humain sain avec celui de lignées cellulaires rénales ainsi que de cultures primaires de cellules épithéliales rénales.

**Tableau 2 : Liste des gènes présents sur les plaques TLDA à façon (384 puits)**

**Enzymes de Phase I**

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	
<b>Alcohol DHases</b>										
ADH1A	Hs00605167_g1	ALDH1A1	Hs00913261_m1	CYP4F8	Hs01027814_m1	FMO4	Hs00157614_m1	ESD	Hs00382667_m1	
ADH1B	Hs00605175_m1	<b>Aldehyde oxidase 1</b>		CYP4F11	Hs01680107_m1	FMO5	Hs00356233_m1	<b>Paraoxonases</b>		
ADH1C	Hs00817827_m1	AOX1	Hs00154079_m1	CYP4F12	Hs00430602_g1	<b>Amine oxidases</b>			PON1*	Hs00166557_m1
ADH4	Hs00923466_m1	<b>Xanthine DHase</b>		CYP4F22	Hs00403446_m1	ABP1	Hs00175631_m1	PON2	Hs00165563_m1	
ADH5	Hs00605185_m1	XDH	Hs00166010_m1	CYP4V2	Hs01389878_m1	AOC2	Hs00241783_m1	PON3	Hs00412993_m1	
ADH6	Hs00167423_m1	<b>Cytochromes P450</b>		CYP4X1	Hs00380077_m1	AOC3	Hs00186647_m1	<b>REDUCTASES</b>		
ADH7	Hs00609447_m1	CYP1A1	Hs00153120_m1	CYP4Z1	Hs00419990_m1	AOF1	Hs00400708_m1	<b>Aldo-keto reductases</b>		
ADHFE1	Hs00329084_m1	CYP1A2	Hs00167927_m1	CYP5A1	Hs00233423_m1	AOF2	Hs00323448_m1	AKR1A1		Hs00195992_m1
<b>Alcohol DHases/reductases</b>										
DHRS2	Hs00195090_m1	CYP1B1	Hs00164383_m1	CYP7A1	Hs00167982_m1	<b>Monoamine oxidases</b>			AKR1B1	Hs00739326_m1
DHRS4	Hs00426372_m1	CYP2A6	Hs00868409_s1	CYP7B1	Hs00191385_m1	MAOA	Hs00165140_m1	AKR1B10	Hs00252524_m1	
DHRS9	Hs00608375_m1	CYP2A7	Hs00751187_gH	CYP8A1	Hs00919949_m1	MAOB	Hs00168533_m1	AKR1C1/2	Hs00413886_m1	
<b>Hydroxysteroid DHase</b>										
HSD17B10	Hs00189576_m1	CYP2A13	Hs00426372_m1	CYP8B1	Hs00244754_s1	<b>Polyamine oxidase</b>			AKR1C3	Hs00366267_m1
<b>Aldehyde DHases</b>										
ALDH1A1	Hs00167445_m1	CYP2B6	Hs03044634_m1	CYP11A1	Hs00167984_m1	PAOX	Hs00382210_m1	AKR1C4	Hs00559542_m1	
ALDH1A2	Hs00180254_m1	CYP2C8	Hs00258314_m1	CYP11B1	Hs01596404_m1	<b>Sulfite oxidase</b>			AKR1C4	Hs00559542_m1
ALDH1A3	Hs00167476_m1	CYP2C9	Hs00426397_m1	CYP11B2	Hs01597732_m1	SUOX	Hs00166578_m1	AKR1CL1	Hs01397413_m1	
ALDH1B1	Hs00377718_m1	CYP2C18	Hs01595322_mH	CYP17A1	Hs00164375_m1	<b>Dihydropyrimidine DHase</b>			AKR1CL2	Hs00230170_m1
ALDH1L1	Hs00201836_m1	CYP2C19	Hs00426380_m1	CYP19A1	Hs00903413_m1	DPYD	Hs00559279_m1	AKR1D1	Hs00818881_m1	
ALDH2	Hs00355914_m1	CYP2D6	Hs00164385_m1	CYP20A1	Hs00221087_m1	<b>HYDROLASES</b>			AKR6A3*	Hs00963155_m1
ALDH3A1*	Hs00964880_m1	CYP2E1	Hs00559370_m1	CYP21A2	Hs00416901_g1	<b>Arylacetamide deacetylase</b>			AKR6A5	Hs00186308_m1
ALDH3A2	Hs00166066_m1	CYP2F1	Hs00167949_m1	CYP2A1	Hs00167999_m1	AADAC	Hs00153677_m1	AKR6A9	Hs00190986_m1	
ALDH3B1	Hs00167488_m1	CYP2J2	Hs00951113_m1	CYP26A1	Hs00219866_m1	<b>Butyrylcholinesterase</b>			AKR7A2	Hs00761005_s1
ALDH3B2	Hs00167496_m1	CYP2R1	Hs01379776_m1	CYP26B1	Hs00219866_m1	BCHE	Hs00163746_m1	AKR7A3	Hs00792041_gH	
ALDH4A1	Hs00186689_m1	CYP2S1	Hs00258076_m1	CYP26C1	Hs01595346_m1	<b>Carboxylesterases</b>			AKR7L*	Hs01651386_gH
ALDH5A1*	Hs00153566_m1	CYP2U1	Hs00766273_m1	CYP27A1	Hs01026016_m1	CES1	Hs00275607_m1	<b>Carbonyl reductases</b>		
ALDH6A1	Hs00194421_m1	CYP2W1	Hs00214994_m1	CYP27B1	Hs00168017_m1	CES2*	Hs00187279_m1	CBR1	Hs00156323_m1	
ALDH7A1	Hs00609622_m1	CYP3A4	Hs00430021_m1	CYP27C1	Hs01382794_m1	CES3	Hs00227775_m1	CBR3	Hs00154295_m1	
ALDH8A1	Hs00224021_m1	CYP3A5	Hs00241417_m1	CYP39A1	Hs00213201_m1	CES4	Hs00750233_s1	CBR4	Hs00379036_m1	
ALDH9A1	Hs00355924_m1	CYP3A7	Hs00426361_m1	CYP46A1	Hs00198510_m1	CES7	Hs00326937_m1	<b>Quinone DHases</b>		
		CYP3A43	Hs00256159_m1	CYP51A1	Hs00426415_m1	<b>Epoxide hydrolases</b>			NQO1	Hs00168547_m1
		CYP4A11/22	Hs00167961_m1	<b>Flavin monooxygenases</b>		EPHX1	Hs01116807_m1	NQO2		Hs00168552_m1
		CYP4B1	Hs00167970_m1	FMO1	Hs00266654_m1	EPHX2	Hs00157403_m1	Sepiapterin reductase		
		CYP4F2	Hs00426608_m1	FMO2	Hs00155158_m1	SPR				Hs00268403_m1

**Enzymes de Phase II**

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID		
NAT1	Hs00377717_m1	UGT2B7	Hs00456682_s1	GSTM4	Hs00426332_m1	GNMT	Hs00219089_m1	SULT1C4	Hs00381155_m1		
NAT2	Hs00605099_m1	UGT2B11	Hs01894900_gH	GSTM5	Hs00757076_m1	<b>Histamine N-MT</b>		SULT1E1	Hs00960941_m1		
NAT5	Hs00211492_m1	UGT2B15	Hs00870076_s1	GSTO1	Hs00818731_m1	HNMT	Hs00199373_m1	SULT2A1	Hs00234219_m1		
<b>Arylalkylamine N-acetyl-Tfase</b>											
AANAT	Hs00153690_m1	UGT2B17	Hs00854486_sH	GSTO2	Hs00826661_m1	<b>Indolethylamine N-MT</b>		SULT2B1	Hs00190268_m1		
<b>UDP- GLYCOSYL-Tfases</b>											
UGT1A1	Hs02511055_s1	UGT2B28	Hs00852540_s1	GSTP1	Hs00168310_m1	INMT	Hs00198941_m1	SULT4A1	Hs00205005_m1		
UGT1A4	Hs01655285_s1	UGT3A1	Hs00329313_m1	GSTT1	Hs00184475_m1	<b>Nicotinamide N-MT</b>			SULT6B1	Hs01376028_m1	
UGT1A5	Hs01374521_s1	UGT3A2	Hs00697723_m1	GSTT2/2B	Hs00168315_m1	NNMT	Hs00196287_m1	<b>OTHER Tfases</b>			
UGT1A6	Hs01592477_m1	UGT8	Hs00409961_m1	GSTZ1	Hs01041668_m1	<b>Phenylethanolamine N-MT</b>			Glycine N-choloyl-Tfase		
UGT1A7	Hs02517015_s1	<b>GLUTATHIONE S-Tfases</b>		MGST1	Hs00220393_m1	PNMT*	Hs00160228_m1	BAAT	Hs00156051_m1		
UGT1A8	Hs01592482_m1	GSTA1	Hs00275575_m1	MGST2	Hs00182064_m1	<b>Thiopurine S-MT</b>			Gamma-glutamyl-Tfase 1		
UGT1A9	Hs02516855_sH	GSTA2	Hs00747232_mH	MGST3	Hs01058946_m1	TPMT	Hs00740082_mH	GGT1	Hs00980756_m1		
UGT1A10	Hs02516990_s1	GSTA3*	Hs00374175_m1	<b>METHYL-Tfases (MT)</b>		<b>SULFO-Tfases</b>					
UGT2A1	Hs00792016_m1	GSTA4	Hs00155308_m1	AS3MT	Hs00221125_m1	SULT1A1	Hs00738644_m1	Glycine-N-acyl-Tfase			
UGT2A3	Hs00226904_m1	GSTA5	Hs00604085_m1	<b>Arsenic MT</b>		SULT1A2	Hs02340929_g1	GLYAT		Hs00973654_m1	
UGT2B4	Hs00607514_mH	GSTK1	Hs00210861_m1	<b>Catechol-O-MT</b>		SULT1A3/4	Hs00413970_m1	Mercaptopyruvate sulfur-Tfase			
		GSTM1*	Hs02341469_m1	COMT*	Hs00241349_m1	SULT1B1	Hs00234899_m1	MPST		Hs00560401_m1	
		GSTM2	Hs00265266_g1							Thiosulfate sulfur-Tfase	
										TST	Hs00361812_m1

*Transporteurs*

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
<b>ABC TRANSPORTERS</b>									
ABCA1	Hs01059122_m1	ABCC6	Hs00184566_m1	SLC7A6	Hs00938056_m1	SLC22A12	Hs00375985_m1	SLCO4A1	Hs00249583_m1
ABCA2	Hs00242232_m1	ABCC8	Hs01093761_m1	SLC7A7	Hs00909952_m1	SLC22A16	Hs00263925_m1	SLCO4C1	Hs00698884_m1
ABCA3	Hs00975530_m1	ABCC9	Hs00245832_m1	SLC7A8	Hs00794796_m1	SLC25A13	Hs00185185_m1	SLCO5A1	Hs00229597_m1
ABCA4	Hs00184367_m1	ABCC10	Hs00375716_m1	SLC7A11	Hs00204928_m1	SLC28A1	Hs00984403_m1	SLCO6A1	Hs00542846_m1
ABCA7	Hs01105117_m1	ABCC11	Hs01090768_m1	SLC10A1	Hs00161820_m1	SLC28A2	Hs00188407_m1		
ABCA8	Hs00992371_m1	ABCC12	Hs00264354_m1	SLC10A2	Hs00166561_m1	SLC28A3	Hs00223220_m1	<b>OTHER TRANSPORTERS</b>	
ABCB1	Hs00184491_m1	ABCD4	Hs00245340_m1	SLC15A1	Hs00192639_m1	SLC29A1	Hs01085706_m1	<u>Aquaporins</u>	
ABCB2	Hs00388682_m1	ABCG2	Hs01053787_m1	SLC15A2	Hs00221539_m1	SLC29A2	Hs00155426_m1	AQP1	Hs00166067_m1
ABCB3	Hs00241060_m1	ABCG8	Hs02880035_m1	SLC16A1	Hs00161826_m1	SLC29A3	Hs00983219_m1	AQP7	Hs00357359_m1
ABCB4	Hs00240956_m1	<b>SOLUTE CARRIERS</b>		SLC18A2	Hs00161858_m1	SLC29A4	Hs00542001_m1	AQP9	Hs00175573_m1
ABCB5	Hs00698751_m1	SLC1A1	Hs00188172_m1	SLC19A1	Hs00953345_m1	SLC31A1	Hs00977268_g1	<u>ATPase, H+ transporting, V0c</u>	
ABCB6	Hs00180568_m1	SLC1A2	Hs00188189_m1	SLC19A2	Hs00949693_m1	SLC38A1	Hs01562168_m1	ATP6V0C	Hs00798308_sH
ABCB7	Hs00188776_m1	SLC1A3	Hs00188193_m1	SLC19A3	Hs00375596_m1	SLC38A2	Hs01089954_m1	<u>ATPases, Cu++ transporting</u>	
ABCB8	Hs00185159_m1	SLC1A6	Hs00192604_m1	SLC22A1	Hs00427554_m1	SLC38A5	Hs01012028_m1	ATP7A	Hs00163707_m1
ABCB9	Hs00608640_m1	SLC1A7	Hs00198515_m1	SLC22A2	Hs00533907_m1	SLC47A1	Hs00217320_m1	ATP7B	Hs00163739_m1
ABCB10	Hs01085315_m1	SLC2A1	Hs00197884_m1	SLC22A3	Hs00222691_m1	SLC47A2	Hs00945650_m1	<u>Potassium channel, K9</u>	
ABCB11	Hs00184824_m1	SLC3A1	Hs00165789_m1	SLC22A4	Hs00268200_m1	SLCO1A2	Hs00366488_m1	KCNK9	Hs00363153_m1
ABCC1	Hs00219905_m1	SLC3A2	Hs00374243_m1	SLC22A5	Hs00929869_m1	SLCO1B1	Hs00272374_m1	<u>Major vault protein</u>	
ABCC2	Hs00166123_m1	SLC5A4	Hs00429527_m1	SLC22A6	Hs00537914_m1	SLCO1B3	Hs00251986_m1	MVP	Hs00245438_m1
ABCC3	Hs00358656_m1	SLC6A3	Hs00997364_m1	SLC22A7	Hs00198527_m1	SLCO1C1	Hs00213714_m1	<u>Voltage-dependent anion channels</u>	
ABCC4	Hs00195260_m1	SLC6A4	Hs00169010_m1	SLC22A8	Hs01056647_m1	SLCO2A1	Hs00194554_m1	VDAC2	Hs00748551_s1
ABCC5*	Hs00981089_m1	SLC7A5	Hs00185826_m1	SLC22A9	Hs00375768_m1	SLCO2B1	Hs00200670_m1	VDAC3	Hs00366592_m1
				SLC22A11	Hs00218486_m1	SLCO3A1	Hs00203184_m1		

*Récepteurs nucléaires et facteurs de transcription*

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
<u>Aryl hydrocarbon receptor</u>									
AHR	Hs00169233_m1	ESR2	Hs00230957_m1	NCOA2	Hs00896106_m1	NR3C1(GR)	Hs00353740_m1	<u>Retinoic acid receptors</u>	
<u>AHR repressor</u>		<u>Forkhead boxes</u>		NCOA3	Hs00180722_m1	NR3C2(MR)		RARA	Hs00940446_m1
AHRR	Hs00324967_m1	FOXA2	Hs00232764_m1	<u>Nuclear receptor co-repressors</u>		NR5A2(FTF)		RARB	Hs00233407_m1
<u>AHR interacting protein</u>		FOXO1	Hs01054576_m1	NCOR1	Hs00196920_m1	<u>Peroxisome proliferator-activated receptors</u>		RARG	Hs01559234_m1
AIP	Hs00610222_m1	<u>Hypoxia-inducible factors</u>		NCOR2	Hs00196955_m1	PPARA	Hs00231882_m1	<u>Retinoid X receptors</u>	
<u>AHR nuclear translocators</u>		HIF1A	Hs00153153_m1	<u>Nuclear factor erythroid-2-like 2</u>		PPARD	Hs00602622_m1	RXRA	Hs01067640_m1
ARNT	Hs01121918_m1	HIF3A	Hs00541709_m1	NFE2L2	Hs00232352_m1	PPARG	Hs01115513_m1	RXRβ	Hs00232774_m1
ARNT2	Hs00208298_m1	<u>Hepatocyte nuclear factor 4α</u>		<u>Nuclear receptors</u>		PPARG coactivators		RXRG	Hs00199455_m1
<u>CREB binding protein</u>		HNF4A	Hs00604435_m1	NR0B2(SHP)		PPARGC1A	Hs00173304_m1	<u>Thyroid hormone receptors</u>	
CREBBP	Hs00231733_m1	<u>Heat shock protein 90α, A1</u>		NR1H2(LXRβ)	Hs00173195_m1	PPARGC1B	Hs00370186_m1	THRA	Hs00268470_m1
<u>E1A binding protein p300</u>		HSP90AA	Hs00743767_sH	NR1H3(LXRα)	Hs00172885_m1	PPARG coactivator-related 1		THRB	Hs00230861_m1
EP300	Hs00230938_m1	<u>Kelch-like ech-associated</u>		NR1H4(FXR)		PPRC1	Hs00209379_m1	<u>THR interactor 11</u>	
<u>Estrogen receptors</u>		KEAP1	Hs00202227_m1	NR1I2(PXR)		<u>Prostaglandin E synthase 3</u>		TRIP11	Hs00188542_m1
ESR1	Hs01046818_m1	<u>Nuclear receptor coactivators</u>		NR1I3(CAR)		PTGES3	Hs00832847_gH	<u>Vitamin D receptor</u>	
		NCOA1	Hs00186661_m1					VDR	Hs01045840_m1

*Autres gènes*

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	
<b>METALLOTHIONEINES</b>										
MT1A	Hs00831826_s1	MT3	Hs00359394_g1	<u>Cellular retinoic acid binding proteins</u>		GZMB	Hs00188051_m1	RBP2	Hs00188160_m1	
MT1B	Hs00538861_m1	MT4	Hs00262914_m1	CRABP1	Hs00171635_m1	<u>Methylenetetrahydrofolate reductase</u>		<u>Syntaxin 2</u>		
MT1F	Hs00744661_sH	<b>Divers</b>		CRABP2	Hs00275636_m1	MTHFR	Hs00293639_s1	STX2		Hs00181827_m1
MT1H	Hs00823168_g1	<u>Bleomycin hydrolase</u>		<u>Cytochrome b5 type A</u>		<u>P450 oxidoreductase</u>		tumor protein p53		
MT1M	Hs00828387_g1	BLMH	Hs00166071_m1	CYB5A	Hs00157217_m1	POR	Hs00287016_m1	TP53	Hs00153349_m1	
MT1X	Hs00745167_sH	<u>Granzymes</u>		<u>Granzymes</u>		<u>Retinol binding proteins</u>		<u>Thioredoxins</u>		
MT2A	Hs02379661_g1	GZMA*	Hs00196206_m1			RBP1	Hs00161252_m1	TXN	Hs00828652_m1	
								TXN2	Hs00429399_g1	

## Matériel et méthodes

### Echantillons analysés

Les échantillons de tissus rénaux sains proviennent de pièces de néphrectomies réalisées pour cancer du rein (service d'Urologie du CHRU de Lille, Pr A. Villers, Dr Zini). Les prélèvements tissulaires (échantillons macroscopiquement sains de tissu rénal) sont effectués dans la zone corticale du rein par les médecins du service d'anatomopathologie. La qualité histologique des échantillons est vérifiée par étude en microscopie optique (notamment l'absence de tissu tumoral envahissant le tissu dit « sain »). Les échantillons de tissus sont transmis par la tumorothèque CHRU/COL, sous forme cryoconservée. Dans ce travail, nous avons exclu de travailler sur des échantillons de tissu rénal provenant du prélèvement rénal réalisé pour la transplantation rénale : en effet ce tissu subit un processus d'ischémie qui pourrait altérer l'expression des EMTX.

Différentes lignées et cultures primaires ont été étudiées : HK2 (lignée de cellules tubulaires rénales humaines, collection ATCC (American Type Culture Collection ; LGC Standards, Molsheim, France) : ref CRL-2190) ; HEK 293 (lignée cellulaire de rein embryonnaire humain, ATCC : ref CRL-1573), culture primaire commerciale HRCEpiC (Human Renal Cortical Epithelial Cells), HRPTEpiC (Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells), HREpiC (Human Renal Epithelial Cells) (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Enfin, des cultures primaires de cellules tubulaires proximales rénales ont été réalisées au laboratoire à partir de parenchyme rénal sain provenant de pièces de néphrectomie. Après une fragmentation mécanique du tissu et une dissociation cellulaire par de la collagénase IV et de la dispase, les cellules sont sélectionnées par un tri positif en cytométrie de flux (marquage par anticorps anti-CD10 et anti -CD13) (INSERM U837 unité 5, Dr. M Perrais ; Van Der Hauwaert. *et al.*, soumis).

### Analyse de l'expression des 380 gènes



Les échantillons tissulaires sont broyés et homogénéisés. L'ARNt, l'ADNg et les protéines ont ensuite été extraits sur une colonne de gel de silice à l'aide du kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Les ADNg et d'ARNt sont dosés par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop® (Fischer, Illkirch, France). La qualité des ARNt est contrôlée par micro-électrophorèse capillaire sur Experion® (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). La détermination de la qualité des ARN extraits s'effectue grâce à un coefficient RQI, basé sur l'aspect des pics des ARNr 18S et 28S ainsi que de la valeur des intensités des pics 28S/18S. Le RQI est calculé par le logiciel Experion®. On considère que, si le  $RQI > 8$ , les ARNt sont de qualité satisfaisante pour une analyse en PCR en temps réel.

La synthèse d'ADNc a été réalisée à l'aide du kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems).

L'analyse de l'expression des gènes d'intérêt est réalisée par PCR en temps réel sur support Taqman Low Density Array ou TLDA (Applied Biosystems), à l'aide de l'automate Real-time RT-PCR Applied Biosystems 7900HT. Une microplaque TLDA de 384 puits, prête à l'emploi, contient dans chaque puits, sous forme lyophilisée, une sonde Taqman et un couple d'amorces de PCR spécifiques d'un gène cible. Chaque plaque contient également des amorces spécifiques de gènes de référence nécessaires pour la normalisation des résultats. Les concentrations en acides nucléiques cibles sont mesurées de façon relative par rapport à une référence endogène. Après avoir testé la stabilité de 14 gènes endogènes dans 8 échantillons de tissu rénal, le gène PPIA (PeptidylProlylsomerase A) a été choisi.

L'utilisation de la référence endogène permet de normaliser les différences liées à la quantité et la qualité des ARN extraits ou à l'efficacité de la rétro-transcription. La quantification du nombre de molécules de messagers contenues dans les tissus analysés est réalisée par la méthode comparative des Ct (Cycle threshold ou cycle seuil), le cycle seuil correspondant au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence d'émission du reporter statistiquement et significativement différent du bruit de fond. La ligne de base, qui reflète

l'intensité du bruit de fond de fluorescence, est établie par le logiciel Sequence Detector Software SDS 2.3 (Applied Biosystems) au cours des 15 premiers cycles d'amplification. Le seuil de significativité du signal de fluorescence est déterminé automatiquement par le logiciel à partir des courbes d'amplification représentant le  $\Delta R_n$  en fonction du nombre de cycles, où  $\Delta R_n = R_n - (\text{ligne de base})$  et  $R_n$  est l'intensité de fluorescence d'émission du reporter normalisé. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil  $C_t$ , qui est directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon. La quantité de transcrits présents dans les tissus analysés est normalisée par rapport au gène endogène de référence ( $DC_t = C_t \text{ gène} - C_t \text{ gène endogène de référence}$ ).

#### Génotypage de l'allèle *GSTT1* « null »

La présence de l'allèle *GSTT1* « null » a été détectée par PCR selon la méthode décrite par Spurdle *et al.* (2001) avec quelques modifications. Le mélange réactionnel est composé de 200 ng d'ADN génomique, des amorces sens 5'-GGTCATTCTGAAGGCCAAGG-3' et anti-sens 5'-TTTGTGGACTGCTGAGGACG-3' à 0,4  $\mu\text{M}$ , de dNTP à 200  $\mu\text{M}$  chacun et de 0,62 Unité de Taq Polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$  de tampon Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, à pH 8,4. Le mélange réactionnel est placé dans un thermocycler (Verity, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et, après une étape de dénaturation initiale de 3 min à 94°C, est soumis à 34 cycles de 94°C pendant 1 min, 60°C pendant 45 s et 72°C pendant 1 min. Une extension finale de 7 min à 72°C termine la réaction d'amplification. Les produits de réaction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% contenant un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium.

#### Analyse statistique.

Les variables catégorielles sont décrites par leur nombre absolu et leurs proportions, les variables continues sont décrites par leur moyenne  $\pm$  déviation standard ou leur médiane. Les caractéristiques de base ont été comparées, selon le génotype avec test du  $\chi^2$  pour

les variables catégorielles et des analyses de variance pour les variables continues. Le seuil de significativité a été fixé à 5%. L'étude de la corrélation entre les valeurs de DCt des différents échantillons analysés a été réalisée par calcul du coefficient R de Spearman, avec calcul de sa significativité. Une analyse par clustering hiérarchique a également été réalisée, en utilisant la distance Euclidienne entre les différents DCt calculés. Le seuil de significativité a été fixé à 5% (SPSS v17.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## **Résultats-Discussion.**

### **A/ Niveaux d'expression des EMTX.**

#### 1/ Etapes pré-analytiques

Trente six échantillons, ont été analysés. La concentration moyenne en ARNt des échantillons est de  $214 \pm 107$  ng/ $\mu$ L. Cependant, pour de nombreux échantillons, nous avons observé une dégradation des ARNt extraits ( $RQI < 8$ ), ne permettant pas une analyse optimale par RT-PCR. Parmi les 36 extractions d'ARN effectuées à partir d'échantillons de tissus sains, seuls 8 échantillons d'ARN ne sont pas dégradés (22% des échantillons), et donc analysable par PCR en temps réel sur support TLDA. Le nombre restreint d'échantillons analysables a limité la portée des analyses statistiques de variabilité interindividuelle.

#### 2/ Expression globale des EMTX.

Les enzymes de phase I sont largement exprimées. Cette tendance est en adéquation avec les données disponibles dans la littérature pour les cytochromes P450 (Lash *et al.*, 1994). Plus précisément, les CYP4A11/4A22 et les ALDH6A1 et ALDH4A1 sont les EMTX de phase I qui présentent les niveaux d'expression les plus élevés.

Les CYP4A11 et CYP4A22 humains, présentant 95% d'homologie nucléotidique, ne sont pas distingués par les amorces proposées par la société Applied Biosystems. Les CYP4As interviennent dans le métabolisme des acides gras à moyennes et longues chaînes comme

l'acide arachidonique, en donnant naissance à des métabolites vasoactifs : majoritairement l'acide 20-HydroxyEicosaTétraÉnoïque (20-HETE) et l'acide 19-hydroxyeicosatétraénoïque (19-HETE) (Miyata *et al.*, 2005, Lasker *et al.*, 2000). Le 20-HETE joue un rôle important dans la régulation de la résistance vasculaire rénale (Kroetz *et al.*, 2002). Il agit comme un puissant vasoconstricteur au niveau des artérioles rénales et intervient également sur la réabsorption du sodium en inhibant l'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase au niveau du tubule proximal (Fleming *et al.*, 2005). Le blocage pharmacologique de la synthèse de 20-HETE protège le rein des lésions d'ischémie reperfusion (Hoff *et al.*, 2011). Dans une étude ancillaire de l'étude AASK (African American Study of Kidney Disease), un polymorphisme génétique du *CYP4A11* (8590 T>C), a été associé à une sévérité accrue de l'hypertension artérielle chez les hommes AfroAméricains, et à une progression plus rapide vers l'insuffisance rénale chronique terminale (Gainer *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'expression d'AKR1B1 est élevée. Ce résultat est conforme avec les données de la littérature (Bondy *et al.*, 1989). AKR1B1 est une aldo-céto-réductase impliquée dans la détoxification de molécules endogènes et exogènes possédant une fonction carbonyle et catalyse, par exemple, la conversion du glucose en sorbitol. L'implication d'un polymorphisme génétique affectant la séquence de son gène dans le développement de néphropathie d'étiologie diabétique a été évoquée (Liu *et al.*, 2002). De plus, des souris AKR1B1<sup>-/-</sup> présentent un phénotype proche de celui de la néphropathie diabétique (Aida *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les enzymes de phases II, certaines GST et UGT sont particulièrement exprimées dans le tissu rénal. Les Glutathion S-Transférases (GST) appartiennent à une superfamille d'enzymes impliquées, en particulier, dans la détoxification de composés carcinogènes du tabac. Certaines d'entre elles possèdent une activité anti-oxydante vis à vis des peroxydes d'hydrogène. Les UDP Glucuronosyl Transférases (UGT) se caractérisent par une spécificité de substrats large et relative. En accord avec des résultats déjà publiés (McGurk *et al.*, 1998), trois isoformes sont exprimées à des niveaux

importants par le parenchyme rénal: les UGT1A8, 1A9 et 2B7. Les UGT rénales participent à la clairance locale (intra-rénale), et éventuellement systémique, de nombreux médicaments et autres xénobiotiques (Knights *et al.*, 2010).

Parmi les membres de la superfamille SLC (transporteurs), deux sont fortement exprimés. Il s'agit de SLC22A6 et SLC22A8, des transporteurs d'anions organiques impliqués dans l'excrétion de composés endogènes et exogènes, tels que certaines molécules d'intérêt thérapeutique (méthotrexate, acyclovir, ganciclovir) (Sweet *et al.*, 2005).

En ce qui concerne les protéines impliquées dans la régulation de l'expression des EMTX, les gènes les plus exprimés sont HNF4A et HIF1A1. Concernant HIF1A (Hypoxia-inductible factor-1A), il convient d'être prudent avant toute interprétation définitive sur le niveau d'expression basal de cette protéine. En effet, le parenchyme rénal sain provient de la zone « saine » de pièces de néphrectomie réalisées pour le traitement de carcinome rénal. Il semble que HIF1A, impliqué dans l'induction des EMTX, soit surexprimé dans les cellules tumorales chez des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires (Kitamura *et al.*, 2008), et qu'un faible niveau d'expression ait un niveau protecteur (Manotham *et al.*, 2005).

L'analyse réalisée n'a pas permis d'évaluer de manière différentielle l'expression des EMTX dans le compartiment cortical et médullaire. Dans la littérature, le cortex rénal est décrit comme contenant principalement des isoenzymes de la superfamille des cytochromes P450 et des glutathion transférases. Nos données sont donc cohérentes avec celle précédemment rapportées. Dans la médullaire, il semble que l'expression de ces enzymes décroissent progressivement vers la papille rénale (Davis *et al.*, 1981, Nusing *et al.*, 1990, Lash *et al.*, 1994).

3/ Variabilité d'expression tissulaire rénale des systèmes de défense envers les xénobiotiques.

a/ Analyse globale

L'analyse statistique par corrélation bivariée (entre les tissus) des niveaux d'expression des 380 gènes sélectionnés révèle une forte concordance (globalement sur toutes les corrélations analysées  $R > 0,9$ ,  $p < 0,0001$ ) du profil d'expression entre les 8 échantillons testés (**Tableau 3**)

**Tableau 3 : Matrice de corrélation** (avec étude de leur significativité) des niveaux d'expression des 380 gènes d'intérêt entre 8 tissus rénaux sains analysés.

		Tissu.sain1	Tissu.sain2	Tissu.sain3	Tissu.sain4	Tissu.sain5	Tissu.Sain6	Tissu.sain7	Tissu.sain8
Tissu.sain1	Corrélation de Pearson		0,935	0,896	0,959	0,938	0,928	0,936	0,912
	p		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tissu.sain2	Corrélation de Pearson			0,914	0,951	0,934	0,920	0,943	0,913
	p			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tissu.sain3	Corrélation de Pearson				0,919	0,919	0,922	0,917	0,927
	p				<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tissu.sain4	Corrélation de Pearson					0,939	0,939	0,948	0,925
	p					<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tissu.sain5	Corrélation de Pearson						0,958	0,963	0,950
	p						<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tissu.Sain6	Corrélation de Pearson							0,957	0,957
	p							<0,0001	<0,0001
Tissu.sain7	Corrélation de Pearson								0,948
	p								<0,0001
Tissu.sain8	Corrélation de Pearson								
	p								

b/ Analyse gène par gène.

Une analyse plus fine gène par gène de l'expression rénale des gènes sélectionnés a permis de classer les gènes en plusieurs catégories (**Figure 11**)

- Seuls 19 gènes ne sont pas du tout exprimés dans le parenchyme rénal sain. Il s'agit de ADH7, ADH1A, CYP2A13 CYP2F1, CYP3A7, CYP4F8 CYP11B1, CYP11B2, GSTA5, SLCO1B1 SLCO1B3, SLCO6A1 SLC5A4, SLC10A1 ABCC12, MT4, SULT1C3, SULT2A1

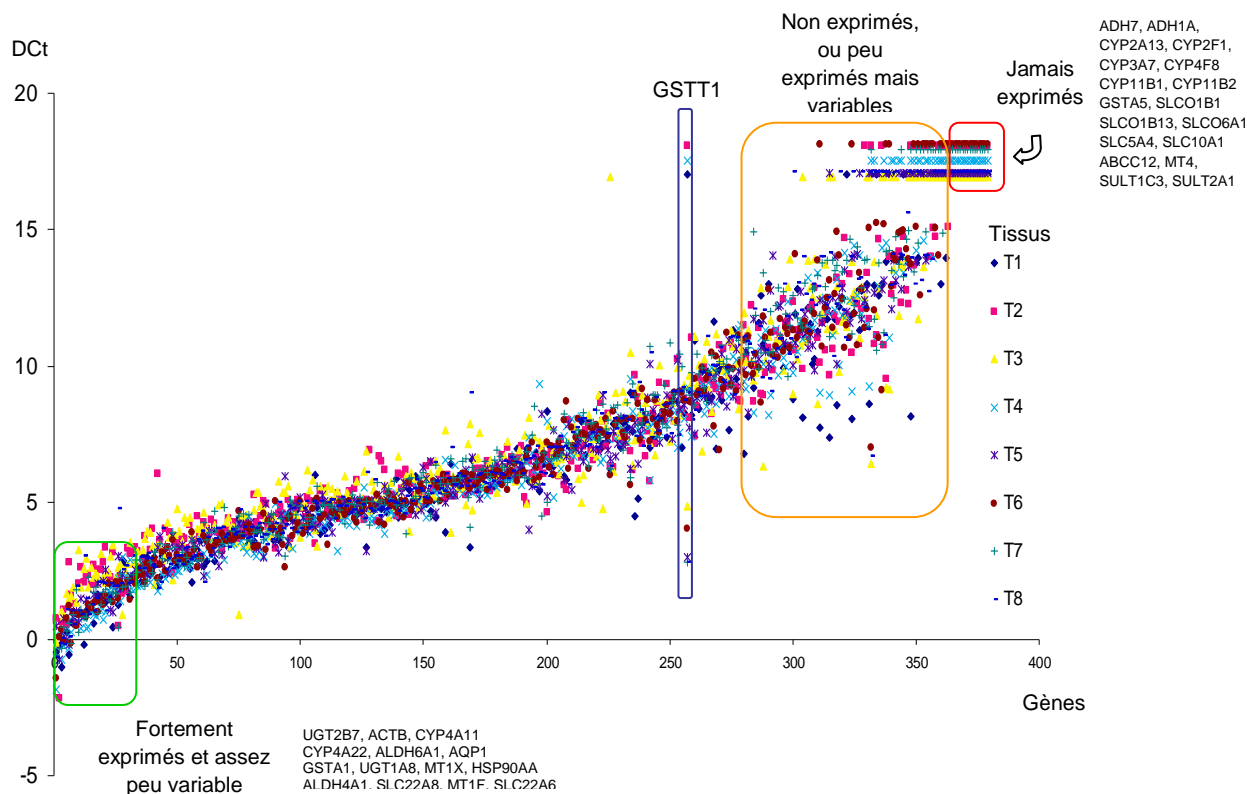
AKR1D1. La grande majorité (94,7%) des gènes sélectionnés est donc exprimée dans le tissu rénal sain. Ces données confirment que le parenchyme rénal possède un arsenal enzymatique et protéique complet capable de prendre en charge de nombreux xénobiotiques.

- Certains gènes sont fortement exprimés (arbitrairement  $DCt < 6$ ) dans tous les tissus analysés avec une faible variabilité d'expression. Par exemple, et par ordre décroissant de niveau moyen d'expression, les 12 gènes les plus exprimés sont : UGT2B7, ACTB, CYP4A11, CYP4A22, ALDH6A1, AQP1, GSTA1, UGT1A8, MT1X, HSP90AA, ALDH4A1, SLC22A8.

- La majorité des gènes sont exprimés à des niveaux moyens ( $6 < DCt < 10$ ), mais la dispersion de leur niveau d'expression paraît globalement assez faible.

- Les gènes faiblement exprimés ( $DCt > 10$ ) ont une variabilité d'expression qui est plus importante. Cependant leur niveau d'expression reste globalement toujours assez faible, il n'est pas certain que cette variabilité interindividuelle soit à l'origine de modifications profondes des capacités de métabolismes des xénobiotiques.

- De manière intéressante, l'expression de GSTT1 présente une variabilité importante entre les tissus analysés. Ainsi, 3 patients n'expriment pas GSTT1, alors que 5 d'entre eux expriment cette protéine à un niveau assez similaire.



**Figure 11: Niveau d'expression (DCt) des 380 gènes sélectionnés (déroulés en abscisse) dans les tissus rénaux sains (représenté par 8 pictogrammes différents) analysés en RT-PCR sur support TLDA.**

#### 4/ Application : Impact du polymorphisme de *GSST1* dans la néphrotoxicité du Tac.

Alors que, dans l'ensemble, le profil d'expression des 380 gènes est assez peu variable d'un patient à l'autre, il existe une forte variation d'expression, pour l'enzyme GSTT1. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur cette protéine.

La Glutathion S-transferase theta 1 (GSTT1) est codée par un gène hautement polymorphe ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2952](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2952)). Chez certains individus, des délétions à l'état homozygote de *GSST1* (perte de 50kB, conduisant à un variant dit « null ») peuvent entraîner une absence totale d'expression de l'enzyme GSTT1 (Singh *et al.*, 2009). Dans



cette étude analysant l'effet de polymorphismes génétiques affectant 4 isoformes des GST (GSTM1, GSTM3, GSTT1 et GSTM1), il a été montré une association statistique entre un polymorphisme génétique de *GSTM1* et le retard de fonctionnement du greffon, ainsi qu'entre le risque de rejet aigu et un variant génétique de *GSTP1*. Par contre le polymorphisme génétique de *GSTT1* ne semblait pas être impliqué dans la survenue d'épisode de rejet aigu ou de retard de fonctionnement du greffon (Singh *et al.*, 2009). Cependant, ce travail n'a été réalisé que chez des patients Indiens, issus d'un seul groupe ethnique.

Etant donné que nous avons montré que certains patients n'expriment pas GSTT1, nous avons souhaité déterminer l'impact du polymorphisme *GSTT1 null*, potentiellement associé à une perte d'expression de GSTT1, dans la survenue des phénomènes de néphrotoxicité du Tac. Compte tenu de l'absence de variabilité d'expression de GSTM1 entre les différents tissus rénaux sains analysés, nous n'avons pas étudié l'impact du polymorphisme génétique de *GSTM1* sur le développement de lésions de néphrotoxicité du Tac.

Ainsi, le génotypage de l'allèle *GSTT1 null* a été réalisé sur l'ADN des donneurs de 172 patients transplantés rénaux (issus de la cohorte décrite dans le chapitre 2 de la section résultats de ce manuscrit, pour lesquels l'ADN du donneur était encore disponible). Trente sept de ces patients (21,5%) ont un génotype GSTT1 null. Cette fréquence est globalement comparable à celle décrite dans la littérature chez les Caucasiens (18,3% en Europe de l'Ouest selon Kurose *et al.*, (2011)).

Dans cette cohorte, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de ce polymorphisme génétique de *GSTT1* sur l'incidence du rejet aigu ou du retard de fonctionnement de greffon. Durant le suivi, 113 biopsies systématiques de greffon (à 3 mois post greffe) et 88 biopsies d'indication clinique ont été réalisées. Sur l'ensemble de ces biopsies la fréquence des lésions de néphrotoxicité du Tac (qu'elles soient tubulaires ou vasculaires, telles que décrites

précédemment dans la partie 2 des résultats) est indépendante du polymorphisme génétique de *GSTT1*. Enfin, la fonction rénale (DFG estimé) deux ans après la greffe n'est pas influencée par la présence de la délétion de *GSTT1* (**Tableau 4**).

Ainsi, bien qu'associé à une très forte variabilité d'expression tissulaire, le polymorphisme *GSST1* null ne semble influencer ni le devenir fonctionnel du greffon rénal, ni les phénomènes histologiques de néphrotoxicité induits par le Tac.

**Tableau 4** : Lésions histologiques de toxicité du Tac et devenir du greffon rénal en fonction du polymorphisme génétique de *GSTT1* du donneur (ns : non significatif)

	<b>Génotype <i>GSTT1</i></b>		
	<i>GSTT1</i> null (N=37)	<i>GSTT1</i> (N=135)	P
<b>Biopsies Systématiques</b>	N= 26	N=87	
Toxicité tubulaire du Tacrolimus	4 (15,4%)	22 (25,3%)	ns
Toxicité vasculaire du Tacrolimus	2 (7,7%)	10 (11,5%)	ns
<b>Biopsies d'indication clinique</b>	N=20	N=68	
Toxicité tubulaire du Tacrolimus	5 (25,0%)	14 (20,6%)	ns
Toxicité vasculaire du Tacrolimus	6 (30,0%)	12 (17,1%)	ns
<b>Rejet aigu</b>	5 (13,5%)	14 (10,4%)	ns
<b>Retard fonctionnement greffon</b>	11 (30,6%)	24,2 (23,8%)	ns
<b>DFGe à 2 ans post greffe (MDRD, ml/mn/1,73m2)</b>	52±23	51±16	ns

## **B/ Comparaison de l'expression des EMTX par le tissu rénal sain et par différents systèmes cellulaires *in vitro*.**

Le but de cette étude était de déterminer quel modèle expérimental cellulaire *in vitro* se rapprochait le plus du tissu rénal sain et de ses capacités à métaboliser les xénobiotiques.

Pour cela, nous avons comparé les profils d'expression des 380 gènes sélectionnés de 8 tissus rénaux sains, de lignées cellulaires, et de cultures primaires de cellules épithéliales . par une analyse de corrélation (**Tableau 5**) et de clustering hiérarchique (**Figure12**).

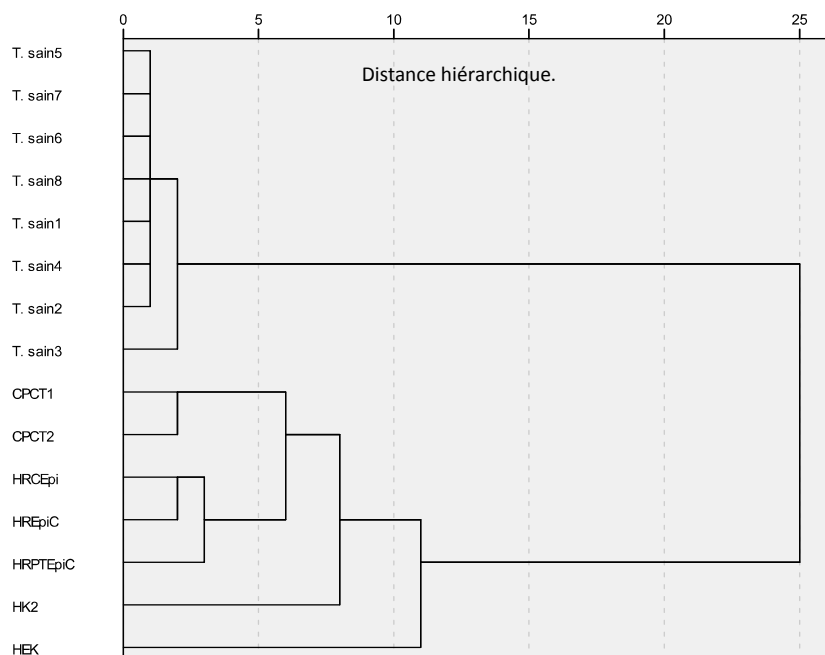
Ces techniques d'analyses statistiques ont permis de confirmer qu'il existe une très forte corrélation entre les tissus sains analysés. Alors que pour tous les systèmes cellulaires, l'expression des EMTX reste significativement corrélée avec celle des tissus sains, des différences importantes entre les modèles sont observées. Les lignées cellulaires HEK293 et HK2 ont la capacité métabolique la plus éloignée de celle des tissus sains (Coefficients de Pearson estimant la corrélation entre les différentes lignées et tissus sains :  $0,49 < R < 0,56$  ;  $p < 0,0001$ ). Les cultures primaires de cellules épithéliales représentent plus fidèlement les capacités métaboliques du rein sain ( $0,51 < R < 0,73$  ;  $p < 0,0001$ ). Cependant, les niveaux d'expression des EMTX par les cultures primaires de cellules tubulaires proximales réalisées dans le laboratoire semblent plus proches de ceux du tissu rénal, comparés aux autres systèmes commerciaux analysés ( $0,66 < R < 0,73$  ;  $p < 0,0001$ ). Nos conclusions concernant les cultures primaires de cellules tubulaires proximales rejoignent celles de Lash *et al.* (2006, 2008), qui considèrent que ces systèmes *in vitro* sont pertinents pour analyser la capacité du tissu rénal à prendre en charge un xénobiotique.

Néanmoins, les cultures primaires ne représentent qu'une sous population cellulaire et ne permettent pas d'appréhender la globalité des systèmes de défense du parenchyme rénal. Cela explique très probablement que les corrélations entre tissus sains et cultures primaires soient sensiblement moins bonnes que les corrélations inter-tissus, et qu'il existe 2 clusters très distincts entre les systèmes *in vitro* et les données obtenues sur le tissu sain. Bien que le modèle de culture primaire n'offre qu'une approche très ciblée du parenchyme rénal, restreinte aux cellules tubulaires proximales, Il faut rappeler que ces cellules sont les cibles privilégiées des agressions par les néphrotoxiques (Nagai *et al.*, 2010).

Au terme de cette analyse préliminaire, nous concluons que les lignées cellulaires HEK293 et HK2 ne sont pas des modèles pertinents pour l'étude de la toxicité rénale des xénobiotiques, et qu'il est préférable d'utiliser des modèles de cultures primaires de cellules tubulaires proximales.

**Tableau 5 : Corrélation des niveaux d'expression de 380 gènes d'intérêt** entre 4 tissus sains, des lignées cellulaires (HEK et HK2), des cultures primaires de cellules épithéliales rénales commerciales (HRCEpiC, HRPTEpiC, HREpiC), et deux cultures primaires de cellules tubulaires proximales réalisées selon le protocole expérimental du laboratoire (CPCT1 et CPCT2).

		T. sain1	T. sain2	T. sain3	T. sain4	CPCT1	CPCT2	HEK	HK2	HREpiC	HRCEpi	HRPTEpiC
T. sain1	Corrélation de Pearson	1,000	0,935	0,896	0,959	0,673	0,660	0,501	0,492	0,513	0,511	0,559
	P		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
T. sain2	Corrélation de Pearson		1,000	0,914	0,951	0,728	0,706	0,564	0,564	0,591	0,604	0,629
	P			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
T. sain3	Corrélation de Pearson			1,000	0,919	0,727	0,709	0,521	0,561	0,569	0,584	0,639
	P				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
T. sain4	Corrélation de Pearson				1,000	0,690	0,675	0,515	0,502	0,520	0,533	0,570
	P					<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CPCT1	Corrélation de Pearson					1,000	0,939	0,649	0,786	0,831	0,867	0,870
	P						<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CPCT2	Corrélation de Pearson						1,000	0,663	0,776	0,834	0,840	0,847
	P							<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HEK	Corrélation de Pearson							1,000	0,756	0,749	0,749	0,726
	P								<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HK2	Corrélation de Pearson								1,000	0,847	0,842	0,868
	P									<0,001	<0,001	<0,001
HREpiC	Corrélation de Pearson									1,000	0,949	0,910
	P										<0,001	<0,001
HRCEpi	Corrélation de Pearson										1,000	0,901
	P											<0,001
HRPTEpiC	Corrélation de Pearson											1,000
	P											



**Figure 12 : Clustering hiérarchique** (représenté en ordonné) entre 8 tissus sains, des lignées cellulaires (HEK et HK2), des cultures primaires de cellules épithéliales rénales commerciales (HRCEpiC, HRPTEpiC, HREpiC), et deux cultures primaires de cellules tubulaires proximales réalisées selon le protocole expérimental du laboratoire (CPCT1 et CPCT2).

## Conclusions.

Pris dans leur globalité, les résultats de ce travail suggèrent que :

- (i) le rein est un organe où les enzymes métabolisant les xénobiotiques et les transporteurs sont largement exprimés.
- (ii) sur un faible nombre d'échantillons analysés, il apparaît une très forte concordance d'expression globale des EMTX entre les individus. Les EMTX les moins exprimés semblent cependant avoir une expression assez variable. Parmi les 380 gènes testés, certains ont une expression très polymorphe, tel par exemple GSTT1.
- (iii) malgré cette forte variabilité d'expression de GSTT1, nous n'avons pu mettre en évidence d'impact d'une délétion homozygote de *GSTT1* (affectant pourtant 20% environ des patients) dans la survenue de phénomènes de néphrotoxicité du Tac.
- (iv) le modèle de culture primaire de cellules tubulaires proximales apparaît être le plus pertinent pour étudier les effets néphrotoxiques d'un xénobiotique.

## **4/ Impact du polymorphisme génétique de *CAV1* du donneur sur les phénomènes de fibrose interstitielle et sur la perte de fonction du greffon rénal.**

### **Introduction-Position du problème**

La néphrotoxicité des ACN est l'un des déterminants majeurs des lésions de fibrose interstitielle. Dans la première partie de ce travail, nous n'avons pas observé de corrélation directe entre la perte du greffon (ou le développement de lésions de fibrose interstitielle) et des polymorphismes génétiques susceptibles de moduler la capacité métabolique du rein à prendre en charge le Tac. Dès lors, la question d'une susceptibilité individuelle à la fibrose, indépendante de toute variation interindividuelle de capacité de prise en charge des ACN, peut être évoquée. Une diminution des systèmes de défense anti-fibrosants pourrait être associée à une plus grande vulnérabilité au Tac. Par ses interactions avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire, la Cavéoline-1 (*CAV-1*) est largement impliquée dans les phénomènes de protection contre la fibrose (*cf* partie 1). Une variabilité interindividuelle d'expression (ou de fonction) de *CAV-1* pourrait être associée au développement plus ou moins important de lésions de fibrose.

Suite aux travaux de Moore *et al.* (2010), nous avons donc entrepris le screening d'un SNP affectant la séquence du gène *CAV1*, (rs4730751) porté par l'ADN du donneur, dans une cohorte locale de 475 patients bénéficiant d'une immunosuppression homogène par Tac. Nous avons cherché à mesurer l'effet de ce polymorphisme génétique sur la fonction du greffon rénal et sur le risque de perte du greffon.

## **Matériel et méthodes**

### Sélection des patients

Des patients transplantés rénaux entre 1997 et 2005 ont été inclus dans ce travail. Sont exclus du recrutement : (i) les patients recevant une transplantation combinée du rein et d'un autre organe (ii) les patients recevant un greffon provenant d'un donneur vivant, (iii) les patients ayant reçu un greffon dont la durée de survie est inférieure à 3 mois (iv) les receveurs de moins de 18 ans (v) les patients pour lesquels l'ADN du donneur n'est pas disponible. Quatre cent soixante quinze patients ont été inclus dans l'étude. Dans ce travail, 209 patients faisaient partie de la cohorte référencée dans la partie 1/ des résultats. La durée moyenne du suivi est de  $4,8 \pm 2,6$  ans après greffe.

Tous les patients ont bénéficié d'un traitement immunosuppresseur homogène associant une induction (antithymoglobuline (ATG) ou anti-CD25), et un traitement d'entretien associant Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil (initialement 2 gr/j, puis 1,5 gr/j) et une corticothérapie (500 mg à J0, 250 mg à J1, puis 20 mg/j jusque J7). La corticothérapie est ensuite interrompue pour les patients sans facteurs de risque immunologiques et sans retard de fonctionnement de greffon. La dose initiale de Tac est de 0,15 mg/kg/j (Prograf®). Par la suite, la posologie journalière est ajustée de manière à obtenir des concentrations sanguines résiduelles comprises entre 10 et 15 ng/mL les 3 premiers mois, et entre 8 et 12 ng/mL la première année. Au delà d'un an, les cibles thérapeutiques sont ajustées afin d'obtenir des dosages résiduels compris entre 6 et 8 ng/mL.

### Données cliniques et histologiques.

Pour chacun des patients inclus les données démographiques, et de suivi clinique sont recueillies. Elles concernent le donneur (cause du décès, âge) et le receveur (date de greffe, date de naissance, poids, taille, durée de l'ischémie froide, nombre de mismatch HLA donneur-receveur, traitement d'induction, survenue d'un retard de fonctionnement de

greffon, épisode de rejets (avec diagnostic histologique, ou traités comme tel sans diagnostic histologique). A 1 an ; 3, 5, 7, 10 ans de suivi post greffe sont colligés les renseignements suivants : poids, créatininémie, DFG estimé par la formule MDRD, protéinurie, traitement immunosuppresseur. Enfin sont enregistrés lors du dernier point disponible : la fonction rénale, ou la date de reprise en dialyse, de nouvelle transplantation, ou de décès (en s'assurant du caractère fonctionnel du greffon lors du décès)

Les résultats histologiques sont donnés selon la classification de Banff mise à jour en 2007. Les rejets classés comme frontières ne sont pas considérés dans notre analyse comme des rejets aigus. Le diagnostic de toxicité des anticalcineurines repose sur la mise en évidence de lésions de vacuolisation isométrique des cellules tubulaires (toxicité aiguë des ACN) et de lésions vasculaires de hyalinose artériolaire (toxicité vasculaire)

#### Constitution des banques d'ADN

L'ADN génomique des donneurs de greffons est extrait à partir de lymphocytes utilisés pour le « cross-match ». Cette banque d'ADN fait l'objet d'une déclaration auprès du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous la référence DC-2008-642.

#### Génotypage du SNP rs4730751C>A affectant le gène CAV1

Un amplicon encadrant le SNP rs4730751C>A a été généré par PCR. Le mélange réactionnel est composé de 200 ng d'ADN génomique, de chaque amorce sens et anti-sens (CAV sens TGGTATCTAACATACAGCC et CAV antisens GGAGGTATGGCATGTGGA) à 0,4 µM, de dNTP (désoxynucléotide triphosphate) à 200 µM chacun et de 0,62 Unité de Taq Polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dans un volume final de 25 µL de tampon Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, à pH 8,4. Le mélange réactionnel est placé dans un thermocycler (Verity, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et soumis à une série d'amplifications. Après vérification de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% après ajout d'un agent intercalant de l'ADN (EvaGreen, Jena Bioscience, Jena,



Allemagne), les amorces oligonucléotidiques en excès sont dégradées par digestion enzymatique à l'aide de l'enzyme Exo Sap-IT (USB, Cleveland Ohio, USA).

Les fragments PCR purifiés sont utilisés comme matrice de séquençage. La réaction de séquence (Sanger) est réalisée à l'aide du kit de séquençage BigDye terminator v3.1 cycle (Applied Biosystems). L'électrophorèse des produits de séquençage a été réalisée sur un séquenceur automatique d'acides nucléiques ABI Prism® 3130 XL 16 capillaries (Applied Biosystems) et les électrophorégrammes ont été analysés avec le logiciel SeqScape Software v.2.5.6 (Applied Biosystems).

### Analyse statistique

Les variables catégorielles sont décrites par les effectifs et proportions, les variables continues par leur moyenne  $\pm$  déviation standard ou leur médiane [25e-75e percentiles]. La comparaison des caractéristiques à l'inclusion selon le génotype a été réalisée avec des tests du Khi2 pour les variables catégorielles et avec des analyses de variance pour les variables continues. Afin de vérifier l'homogénéité de la population de patients, la fréquence du SNP rs4730751C>A a été testée par rapport à la loi d'Hardy-Weinberg à l'aide d'un test du Khi2. La survie du greffon a été estimée par la méthode de Kaplan-Meier, et les fonctions de survie selon le génotype ont été comparées avec un test du logrank.

L'évolution de la créatininémie et du débit de filtration glomérulaire estimées (DFGe) formule MDRD) obtenues pour chaque patient entre 3 mois et 6 ans a été étudiée par une analyse de covariance avec mesures répétées (PROC MIXED, SAS Institute, Cary, NC, États-Unis). Le modèle incluait le temps, le génotype CAV1 et leur interaction comme facteurs prédictifs indépendants, ajustés sur les caractéristiques à l'inclusion. En raison de la distribution non symétrique de la créatininémie et du DFGe, une transformation log10 a été utilisée. La structure de la matrice de covariance des mesures répétées a été spécifiée comme une structure spatiale dépendant du temps pour tenir compte des observations irrégulières. Lorsque la relation entre la créatininémie ou le DFGe n'était pas linéaire par rapport à une

covariable continue, la covariable était recodée en une variable binaire, la valeur seuil étant déterminée comme la valeur minimisant le critère BIC (Bayesian Information Criterion). Les paramètres du modèle ont été testés par des contrastes polynomiaux. Les hypothèses sous-jacentes de la régression ont été vérifiées graphiquement à l'aide des résidus. La significativité a été fixée à  $\alpha = 0,05$ . Les analyses ont été effectuées avec SPSS v17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) et SAS (SAS Institute, Cary, NC, États-Unis).

Ces analyses statistiques ont été réalisées de manière conjointe avec le Dr Claire Pinçon (Laboratoire de Biomathématiques, Faculté de Pharmacie, Lille).

## Résultats

### Fréquences des génotypes.

Les génotypes AA, AC et CC sont respectivement observés chez 7,6% (n=36), 40,8% (n=194) et 51,6% (n=245) des patients. Les fréquences des allèles A (0,28) et C (0,72) sont en équilibre avec la loi de Hardy Weinberg.

### Caractéristique de la population en fonction des différents génotypes.

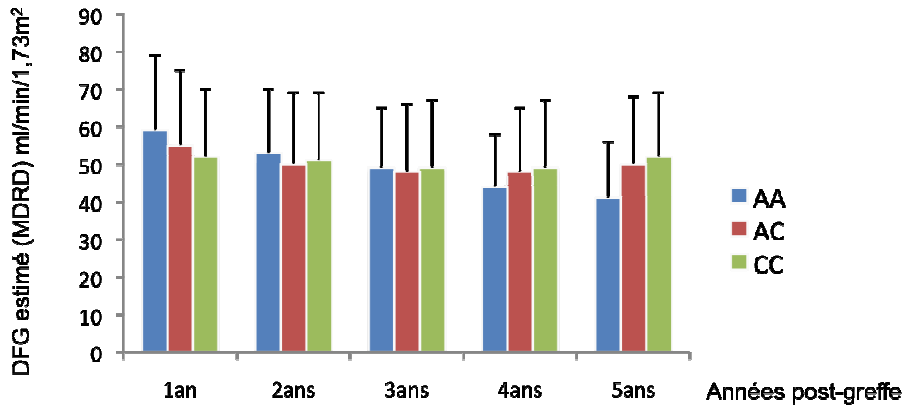
Quelque soit le génotype, les caractéristiques cliniques, démographiques ou de fréquence de survenue de retard de fonctionnement de greffon et de rejet aigu ne sont pas significativement différentes (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Caractéristiques démographiques et cliniques en fonction du génotype CAV1 du donneur**

Variable	Total	Génotype CAV1			p	
		AA (n=36)	AC (n=194)	CC (n=245)		
Sexe du receveur	Homme	300 (63,2)	25 (69,4)	128 (66,0)	147 (60,0)	0.31
	Femme	175 (36,8)	11 (30,6)	66 (34,0)	98 (40,0)	
Sexe du donneur	Homme	328 (69,5)	24 (68,6)	135 (70,3)	169 (69,0)	0.95
	Femme	144 (30,5)	11 (31,4)	57 (29,7)	76 (31,0)	
Age du receveur (années)	49 [38-57]	47 [36-57]	49 [39-58]	49 [38-56]	0.46	
Age du donneur (années)	47 [35-56]	44 [26-54]	48 [35-56]	47 [36-56]	0.59	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 [21-27]	23 [21-25]	24 [21-27]	23 [21-26]	0.33	
Cause de décès du donneur	Non vasculaire	43,0%	53,3%	45,2%	39,8%	0.55
	Vasculaire	57,0%	46,7%	54,8%	60,2%	
Nombre d'histo-incompatibilités	4 [3-4]	4 [3-4]	4 [3-4]	4 [3-4]	0.63	
Statut immunitaire	Non immunisé	426 (90,3)	34 (97,1)	171 (89,1)	221 (90,2)	0.33
	Immunisé	46 (9,7)	1 (2,9)	21 (10,9)	24 (9,8)	
Durée ischémie froide (h)	20 [16-25]	19 [16-25]	20 [16-25]	20 [16-24]	0.71	
Retard de fonction du greffon	98 (22,0%)	4 (12,9%)	47 (25,7%)	47 (20,3%)	0.19	
Rejet aigu	57 (12,1%)	3 (8,6%)	30 (15,6%)	24 (9,8%)	0.14	

## Impact du polymorphisme de CAV1 sur la perte de fonction rénale au fil du temps.

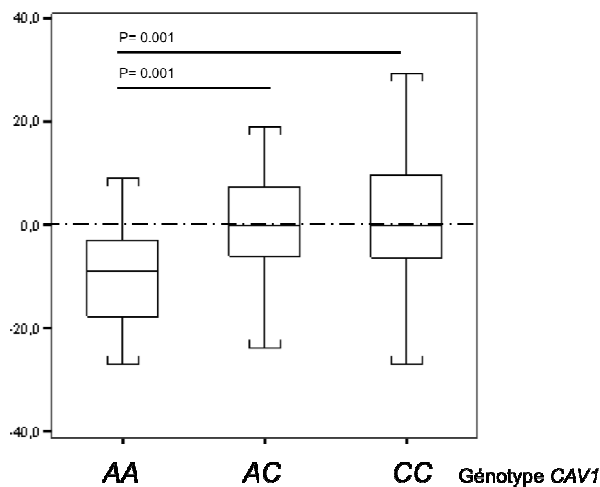
Les patients porteurs d'un greffon de génotype AA paraissent avoir une perte de fonction rénale plus rapide au fil du temps (**Figure 13**).



**Figure 13** : DFG estimé par la formule MDRD (Moyenne±Ecart type), observé à différents temps de la transplantation rénale, en fonction du génotype CAV1.

En analyse univariée, les patients ayant reçu un greffon de génotype AA ont une perte de fonction rénale entre 2 et 5 ans de greffe qui est significativement plus importante que celle observée pour les patients transplantés à partir d'un greffon de génotype AC ou CC (**Figure 14**). Néanmoins, une telle approche apparaît biaisée par les phénomènes de perte de greffons avant 5 ans de greffe, et nécessite une approche complémentaire.

Différence de DFGe entre la 5<sup>ème</sup> et la 2<sup>ème</sup> année post-greffe. (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)



**Figure 14** : Distribution, représentée sous forme de Box Plot, de la perte de fonction rénale (différence de débit de filtration glomérulaire estimé par la formule MDRD) observée entre 2 et 5 ans post greffe) en fonction du génotype CAV1 du donneur.

L'analyse de covariance des mesures répétées (PROC MIXED) montre (**Tableau 7**) une interaction significative entre la créatininémie (transformée en log10) et le génotype ( $p=0,02$ ). L'augmentation de créatininémie entre 3 mois et 6 ans est affectée par le génotype CAV1 de manière indépendante: seuls les patients de génotype AA voient leur créatininémie augmenter de manière significative (comparaison de la pente calculée à une pente nulle :  $p=0,005$ ). Les autres facteurs indépendants d'augmentation de la créatininémie au cours du temps sont : l'âge du donneur ( $p<0,0001$ ), le sexe du receveur (homme :  $p<0,0001$ ) et le nombre d'incompatibilités HLA entre donneur et receveur ( $p=0,04$ ).

**Tableau 7 : Résultats de l'analyse de covariance** à mesures répétées (PROC MIXED) évaluant l'interaction entre la créatininémie (transformée en log10), le génotype CAV1 et les différents paramètres étudiés (seuls les paramètres influençant le modèle sont repris).

Variable		Beta	F	P
Intercept		0.9319		
Génotype CAV1	AA	Référence	4.93	0.008
	AC	0.0515		
	CC	0.0254		
Temps (par année)		0.0262	17.63	<0.0001
Interaction Génotype*Temps (par année)	AA	Référence	3.88	0.02
	AC	-0.0209		
	CC	-0.0219		
Nombre d'incompatibilité HLA	≤4	Référence	4.36	0.04
	>5	0.0609		
Sexe du receveur	Femme	Référence	31.57	<0.0001
	Homme	0.0576		
Age du donneur (par année)		0.0036	84.10	<0.0001

L'analyse de covariance pour l'évolution de DFGe au cours du temps (**Tableau 8**) fournit des résultats concordants avec ceux obtenus pour le simple dosage de créatininémie. Le DFGe diminue de manière significative au fil du temps pour les patients de génotype AA et de génotype AC (comparaison respective de la pente calculée à une pente nulle:  $p=0,0005$  et  $p=0,04$ ). Néanmoins, comparée aux patients de génotype AC, la perte de fonction rénale est plus rapide pour les patients de génotype AA (test d'égalité des pentes:  $p=0,01$ ). Les autres facteurs qui influencent la perte de DFGe sont : l'âge du donneur ( $p<0,0001$ ), le sexe du receveur (homme :  $P<0,001$ ) et les antécédents de rejets aigus ( $p=0,0001$ ).

**Tableau 8 : Résultats de l'analyse de covariance à mesures répétées (PROC MIXED) évaluant l'interaction entre le DFGe (formule MDRD, transformée en log10), le génotype CAV1 et les différents paramètres étudiés (seul les paramètres influençant le modèle sont repris).**

Variable		Beta	F	P
Intercept		1.8358		
Génotype CAV1			5.98	0.003
	AA	Référence		
	AC	-0.0508		
	CC	-0.0310		
Temps (par année)		-0.0298	18.23	<0.0001
Interaction Génotype*Temps (par année)			3.75	0.02
	AA	Référence		
	AC	0.0230		
	CC	0.0249		
Sexe receveur			26.89	<0.0001
	Femme	Référence		
	Homme	0.0605		
Age du donneur (par année)		-0.0045	140.76	<0.0001
Rejet aigu			15.15	0.0001
	Non	Référence		
	Oui	-0.0695		

Impact du polymorphisme génétique de CAV1 sur la protéinurie.

Compte tenu de l'hétérogénéité du mode d'expression des résultats (g/24h ou g/g de créatininurie), les valeurs ont été catégorisées en deux strates : protéinurie inférieure ou supérieure à 300 mg/24h (ou mg/g de créatininurie). En analyse univariée, la protéinurie avérée survient à la même fréquence deux ans après la greffe, quelque soit le génotype (AA : 10%, AC : 17,3%, CC : 19,4% ; p=NS). Cinq ans après la greffe, 35,7% des patients porteurs d'un greffon de génotype AA développent une protéinurie vs 14,3% des patients de génotype CC (p<0,05)

Impact sur l'histologie du greffon rénal.

Nous avons repris les résultats de l'ensemble des 216 biopsies réalisées chez les 207 patients pour lesquels les biopsies de greffons étaient analysées et gradées selon les recommandations de la conférence de Banff.

Cent vingt deux biopsies ont été réalisées de manière systématique, selon notre pratique clinique, après 3 mois de greffe. Quarante vingt quatre biopsies ont été effectuées suite à une indication clinique dans un délai médian de 110 jours [88-470]. Les biopsies sont donc globalement réalisées assez précocement après greffe, laissant ainsi peu de temps à des lésions de fibrose de se développer. Nous avons fait le choix de grouper les lésions de FI/AT de grade I et II, pour isoler les patients qui développent des lésions de fibroses légères à modérées. Quelque soient les indications de biopsies, le génotype CAV1 n'influence ni le développement des lésions de néphrotoxicité du Tac, ni celles de nécrose tubulaire aiguë (**Tableau 9**).

**Tableau 9 : Lésion histologiques observées selon le génotype CAV1, et le type de biopsies réalisées.**

Biopsies effectuées	Génotype CAV1		
	AA	AC	CC
<b>Systématiques</b>	N= 10	N=43	N=69
Nécrose Tubulaire Aiguë	0	0	1 (1,4%)
Toxicité tubulaire du Tacrolimus	1 (10,0%)	7 (16,3%)	18 (26,1%)
Toxicité vasculaire du Tacrolimus	1 (10,0%)	5 (11,6%)	7 (10,1%)
FI/AT grade I ou II	5 (50,0%)	14 (32,6%)	18 (26,1%)
FI/AT grade III	0	1 (2,3%)	0
<b>Biopsies d'indication clinique</b>	N=7	N=38	N=49
Nécrose Tubulaire Aiguë	2 (28,6%)	12 (31,6%)	11 (22,4%)
Toxicité tubulaire du Tacrolimus	1 (14,3%)	5 (13,2%)	9 (18,4%)
Toxicité vasculaire du Tacrolimus	2 (28,6%)	7 (18,4%)	9 (18,4%)
FI/AT grade I ou II	5 (71,4%)*	11 (28,9%)*	5 (10,2%)*
FI/AT grade III	0	1 (2,6%)	3 (6,1%)
<b>Total des biopsies</b>	N=17	N=81	N=118
Nécrose Tubulaire Aiguë	2 (11,8%)	12 (14,8%)	12 (10,2%)
Toxicité tubulaire du Tacrolimus	3 (17,6%)	12 (14,8%)	27 (22,9%)
Toxicité vasculaire du Tacrolimus	3 (17,6%)	12 (14,8%)	16 (13,5%)
FI/AT grade I ou II	10 (58,8%)**	25 (30,8%)**	23 (19,5%)**
FI/AT grade III	0	3 (3,7%)	3 (2,5%)

\* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01

De même la fréquence des lésions de rejet aigu est indépendante du génotype CAV1 (**Tableau 6**). La fréquence des lésions de FI/AT de grade I ou II observée sur l'ensemble des biopsies de greffons et sur les biopsies d'indication clinique est plus élevée lorsque le donneur est de génotype CAV1 AA (**Tableau 9**). Cette différence de fréquence de lésions de FI/AT est également observée sur les biopsies systématiques, mais n'atteint pas la significativité.

### Impact sur la survie du greffon rénal.

En analyse univariée, nous n'avons pu observer aucun effet significatif du polymorphisme de *CAV1* sur la survie du greffon rénal (données non illustrées).

### **Discussion**

Les patients recevant un greffon de génotype *AA* pour *CAV1* ont une perte de fonction rénale accélérée au fil du temps, une protéinurie plus abondante et semblent développer plus fréquemment des lésions histologiques de fibrose interstitielle de grade I ou II. Si l'on se réfère aux données histologiques, il n'existe pas d'association entre les lésions de toxicité aiguë ou chronique (vasculaire) du Tac et le polymorphisme génétique de *CAV1*. Ainsi on peut émettre l'hypothèse que les patients porteurs d'un greffon de génotype *CAV1 AA* développent plus rapidement des lésions fibreuses lorsqu'ils sont exposés au Tac.

Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par Moore *et al.* (2010) et viennent compléter ces travaux, en démontrant, pour les patients de génotype *AA*, un effet sur le développement histologique des lésions de fibrose, et la perte de fonction rénale au fil du temps. De telles données suggèrent que les patients recevant un greffon de génotype *AA* puissent avoir une durée de survie de leur greffon rénal qui soit plus faible. La fréquence du génotype *AA* (« à risque ») est semblable à celle déjà rapportée, mais reste assez faible (7,4%). Nous n'avons pu démontrer un effet sur la survie du greffon, probablement faute d'un effectif suffisant de patients porteur d'un greffon de génotype *CAV1 AA*. Parmi les limites de notre travail, il faut également mentionner les difficultés d'évaluer et de quantifier la fibrose interstitielle. La classification de Banff ne permet pas une évaluation précise de la fibrose et reste une description semi-quantitative. L'utilisation de technique de quantification numérique de la fibrose permettrait de s'affranchir de cet écueil. Pour notre analyse statistique, nous avons fait le choix de regrouper les patients porteurs d'une fibrose interstitielle de grade I et de grade II. Les biopsies que nous avons analysées étaient réalisées de manière précoce et,



ce regroupement permet surtout d'opposer les patients porteurs de lésions de fibrose de ceux qui en sont indemnes. Enfin, il sera nécessaire d'analyser l'exposition au Tac pour évaluer si l'effet du polymorphisme génétique de *CAV1* sur la perte de fonction rénale et la progression de la fibrose est dépendant ou non de l'intensité de l'exposition au Tac.

Si l'on considère, comme Moore *et al.* (2010), la transplantation rénale comme un modèle clinique de fibrose accélérée du parenchyme rénal et le caractère aspécifique de la fibrose en réponse à une d'agression tissulaire, il faut alors envisager que le polymorphisme génétique de *CAV1* puisse influencer l'évolution vers la fibrose d'autres pathologies rénales.

Dans un travail récemment présenté ([www.britishrenal.org/Abstracts/Abstracts-2011.aspx](http://www.britishrenal.org/Abstracts/Abstracts-2011.aspx)) par l'équipe de R. Borrows lors de la British Renal Society 2011, le même polymorphisme génétique de *CAV1* (rs4730751) influence également le pronostic des vascularites à ANCA. Dans une analyse de survie, où le critère de jugement était un critère composite associant mortalité de toute cause ou prise en charge en épuration extra-rénale, les patients de génotype CC (vs AC+AA) atteignent significativement moins rapidement le critère primaire d'évaluation ( $P < 0,004$ ). Ainsi le génotype CC paraît être « protecteur » vis à vis du devenir fonctionnel lors d'affection inflammatoire telles les vascularites à ANCA.

L'impact fonctionnel du SNP rs4730751 du gène *CAV1* n'est pas connu à l'heure actuelle. Ce SNP localisé dans une région intronique pourrait être en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme responsable d'une altération de l'expression ou de la fonction de *CAV-1*. Malgré tout, il apparaît que ce polymorphisme pourrait permettre d'identifier un sous-groupe de population présentant un risque accru de perte de greffon. A ce titre, le rs4730751 pourrait être à terme considéré comme un biomarqueur génétique. De même, ces résultats ouvrent le champ à des études mécanistiques sur l'implication des cavéoles et de *CAV-1* dans les processus de fibroses. Ces molécules pourraient être les nouvelles cibles de traitements anti-fibrosants.

## **Conclusions-Perspectives.**

Alors qu'il affecte significativement la biodisponibilité et l'exposition au Tac (y compris dans sa forme galénique Advagraf®), le polymorphisme génétique de *CYP3A5* (6986 A>G) du receveur n'est statistiquement pas associé à la survenue d'événements cliniques après greffe ou d'une néphrotoxicité particulière. Il convient toutefois de remarquer que dans notre pratique clinique nous avons réduit des posologies de Tac dès le troisième mois de greffe de manière équivalente quel que soit le statut *CYP3A5* du receveur. Cette même mutation du *CYP3A5* portée par le donneur, ainsi que la mutation 3435C>T affectant le gène *ABCB1* du donneur ou du receveur n'influencent ni les paramètres pharmacocinétiques, ni le devenir clinique du greffon. Notre hypothèse initiale d'un lien direct entre un polymorphisme génétique de *CYP3A5* ou de *ABCB1* et le développement accéléré d'une néphrotoxicité du Tac n'a pu être prouvée par ce travail, dans notre cohorte locale. Concernant la capacité de défense du parenchyme rénal vis à vis de l'agression par les xénobiotiques ; le niveau global d'expression, dans le parenchyme rénal sain, de 380 gènes impliqués de manière très générale dans le métabolisme et la prise en charge des xénobiotiques est assez homogène entre les individus. Ainsi, pour expliquer la variabilité interindividuelle de vulnérabilité à la néphrotoxicité du Tac, des facteurs autres que ceux dépendants de la prise en charge des xénobiotiques doivent donc être évoqués. Le polymorphisme génétique, rs4730751 affectant le gène *CAV1* codant pour la cavéoline-1, une protéine inhibitrice de la fibrose tissulaire, influence la perte de fonction du greffon rénal. Ce polymorphisme pourrait directement accentuer la fréquence des lésions de fibrose interstitielle. Ainsi, il est probable qu'indépendamment de leur capacité à métaboliser le Tac, certains patients puissent développer plus facilement que d'autres des lésions de fibrose par toxicité chronique du Tac, *via* certain polymorphismes génétiques tels celui affectant *CAV1*.

De manière plus générale, et en dehors du champ de la transplantation rénale, l'association entre des polymorphismes de gènes codants pour les EMTX et le développement d'une maladie rénale chronique a déjà été évoquée. Dans de large cohortes, une première étude pan génomique d'association (ou GWAS pour Genome Wide

Association Study) a isolé certains polymorphismes génétiques associés à la maladie rénale chronique (MRC), au taux de créatinine plasmatique et/ou au débit de filtration glomérulaire estimé. Ainsi, Chambers *et al.* (2010), ont décrit une association entre MRC et des marqueurs génétiques proches de 3 gènes connus pour coder des protéines impliquées dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques : *NAT8*, *SLC22A2* et *SLC7A9*. Des SNP touchant ces 3 gènes sont associés au taux de créatinine plasmatique et au DFG estimé par la formule MDRD. Les polymorphismes génétiques de *SLC7A9* et *NAT8* sont également associés au taux plasmatique de cystatine et à la survenue d'une MRC. On remarquera toutefois dans cette étude que l'effet des polymorphismes génétiques sur la survenue d'une maladie rénale est globalement assez faible (Odd's Ratio : 0,84). Plus récemment, une autre GWAS retrouve des résultats concordants et observe une relation entre des polymorphismes génétiques proche de *NAT8* et de *SLC7A9* et l'incidence de la MRC (Böger *et al.*, 2011). *NAT8* est une protéine membre d'une famille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement acétyl lors de la prise en charge cellulaire de certains xénobiotiques. *NAT8* est fortement exprimée par les cellules tubulaires rénales. Elle pourrait jouer un rôle dans la détoxification de certains composés tels que les aminosides, ou les solvants industriels (trichloréthylène). Chez des patients hypertendus, un polymorphisme génétique affectant le promoteur de *NAT8* est associé à des modifications du DFGe (Juhanson *et al.*, 2008). *SLC7A9* est un transporteur d'acides aminés fortement exprimé dans les cellules tubulaires. *SLC22A2* est un transporteur de cations organiques probablement impliqué dans la sécrétion tubulaire de substances endogènes (créatinine) et exogènes. Le polymorphisme génétique de *SLC22A2* est associé à la néphrotoxicité du Cis-Platine (Filipski *et al.*, 2009). Les polymorphismes génétiques affectant ces différentes EMTX pourraient expliquer une sensibilité tubulaire particulière aux xénobiotiques néphrotoxiques de l'environnement. De tels résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant à la survenue et/ou à la progression de la maladie rénale chronique: des individus porteurs de polymorphismes génétiques affectant des gènes codant pour des EMTX pourraient être plus

sensibles à certains xénobiotiques et développer et/ou aggraver plus rapidement une maladie rénale chronique quelle qu'en soit l'étiologie.

Au vu de ces résultats, il apparaît pertinent de proposer la réalisation d'études analysant l'impact des polymorphismes de NAT8, SLC22A2 et SLC7A9 sur la perte progressive de fonction rénale au cours de différentes néphropathies.

Si l'on considère le développement de lésions fibreuses rénales comme le terme ultime des phénomènes de néphrotoxicité, il faut également s'interroger sur des polymorphismes génétiques associés à une vulnérabilité à développer des lésions de fibrose. Nos premiers résultats ont permis de confirmer une association entre un polymorphisme du gène *CAV1* et la perte de fonction du greffon rénal, probablement lié au développement de lésions de fibrose. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Moore et al., 2010). Il est cependant difficile d'envisager la poursuite d'autres études *a priori* de ce type tant les cibles moléculaires impliquées dans les lésions de fibrose sont nombreuses. La réalisation d'étude de type GWAS (ou de technique utilisant le séquençage haut débit de l'ensemble de l'exome) permettraient de s'affranchir de cet écueil, mais exige d'importantes cohortes de patients parfaitement caractérisées du point de vue phénotypique (ce qui est difficilement réalisable pour des études portant sur la fibrose rénale).

Au delà de ces explorations du patrimoine génétique et de ses polymorphismes génétiques, d'autres approches portant sur les facteurs régulant l'expression des gènes paraissent pertinentes. Les miARN sont des ARN non codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Ils interagissent au niveau post-transcriptionnel et participent donc au contrôle de l'expression des protéines. On estime que 30% des ARNm peuvent interagir fonctionnellement avec des miRNA (Carthew et al., 2006). Les miARN interviennent en particulier dans l'apoptose, la croissance et la différenciation cellulaire. Ils agissent en général sur plusieurs cibles moléculaires (Li et al., 2010). La découverte de cette voie de régulation a ouvert de nouveaux horizons dans la compréhension des phénomènes de régulation

génique impliqués dans différentes pathologies, notamment néoplasiques, pour lesquelles le niveau d'expression de certains miARN est corrélé à l'agressivité des lésions tissulaires (Sandhu *et al.*, 2011). Par ailleurs, les miARN sont détectables et quantifiables dans le sérum. Leur quantification plasmatique pourrait donc servir de biomarqueur non invasif. En oncologie, les taux plasmatiques de miARN pourraient déjà participer à évaluer le pronostic, ou la réponse au traitement (Cho, 2011). En ce qui concerne les pathologies fibrosantes, il semble que l'implication des miARNs soit très ubiquitaire. En effet, dans la fibrose pulmonaire idiopathique (Yang *et al.*, 2012), cardiaque (Thum *et al.*, 2008) et hépatique (Murakami *et al.*, 2011), le rôle de différents miARNs a pu être démontré. En pathologie rénale, les données sont encore très parcellaires. Dans un modèle murin de néphropathie diabétique induite par la streptozotocine, ainsi que dans un modèle de souris diabétique (db/db), une augmentation du niveau d'expression rénale de miR-192 a été observée. miR-192 semble interagir avec la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et entraîner la sous-expression de SIP1/ZEB2 et la surexpression de ZEB1/ $\delta$ EF1 qui induisent l'augmentation de synthèse de collagène de type 1 (Col1a2) (Kato *et al.*, 2007, Xiong *et al.*, 2012). Les miARN jouent également un rôle important dans la différenciation des podocytes. En effet, l'inactivation des gènes DICER et DROSHA (codant pour les protéines du même nom, impliquées dans la maturation des miARNs) provoque chez la souris des protéinuries et des anomalies de développement des podocytes (Harvey *et al.*, 2008 ; Zhdanova *et al.*, 2011). Enfin, dans une étude portant sur des biopsies rénales humaines, certains profils d'expression de miARNs apparaissent être en relation avec une progression plus ou moins rapide de la néphropathie diabétique et de la perte de fonction rénale (Krupa *et al.*, 2010).

Dans un modèle murin de fibrose rénale après obstruction urétérale, l'expression tissulaire de miR-21 est augmentée, alors que le blocage de miR-21 diminue les lésions fibreuses (Zarjou *et al.*, 2011). Cet impact de miR-21 dans le développement de lésions fibreuses est peut être lié à un effet sur le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). En effet, miR-21 semble intervenir directement dans les phénomènes de TEM, *via* une

modulation de l'effet du TGF $\beta$  (Kumarswamy *et al.*, 2012). Connaissant l'effet de la CsA sur l'induction de la TEM (Hazzan *et al.*, 2011), il paraît opportun d'évaluer l'impact du Tac dans le processus de TEM et d'analyser l'expression de miARNs dans des modèles *in vitro* et/ou *in vivo* d'exposition au Tac

D'une manière plus générale, l'analyse de l'expression des miARNs dans le tissu rénal, mais également dans les fluides biologiques (sérum/urine) pourra déboucher sur la mise au point de nouveaux biomarqueurs diagnostique et/ou pronostic. De telles découvertes devraient pouvoir faire émerger des applications cliniques de médecine personnalisée. Enfin, des antagonistes de miARN sont actuellement développés. Les miARNs pourraient donc devenir des cibles thérapeutiques à part entière.

## **Bibliographie.**

- Aida K, Ikegishi Y, Chen J, Tawata M, Ito S, Maeda S, Onaya T. Disruption of aldose reductase gene (Akr1b1) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(2): 281-6.
- Alloway R, Steinberg S, Khalil K, Gourishankar S, Miller J, Norman D, Hariharan S, Pirsch J, Matas A, Zaltzman J, Wisemandle K, Fitzsimmons W, First MR. Conversion of stable kidney transplant recipients from a twice daily Prograf-based regimen to a once daily modified release tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc.* 2005; 37(2): 867-70.
- Alloway R, Steinberg S, Khalil K, Gourishankar S, Miller J, Norman D, Hariharan S, Pirsch J, Matas A, Zaltzman J, Wisemandle K, Fitzsimmons W, First MR. Two years postconversion from a prograf-based regimen to a once-daily tacrolimus extended-release formulation in stable kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2007; 83(12): 1648-51.
- Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 (7): 1889-96
- Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, Marquet P, Cassinat B, Méria P, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int.* 2006; 70(6): 1019-25.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N, Hall J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; 66 (3): 288-94.
- Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1987; 32: 19–25.
- Beaune P, Lorient MA. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *Médecine/Sciences*, 2000, 16 : 1051-1056.
- Becquemont L, Alfirevic A, Amstutz U, Brauch H, Jacqz-Aigrain E, Laurent-Puig P, Molina MA, Niemi M, Schwab M, Somogyi AA, Thervet E, Maitland-van der Zee AH, van Kuilenburg AB, van Schaik RH, Verstuyft C, Wadelius M, Daly AK. Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2011;12(1):113-24.
- Benish RL, Rodriguez B, Zimmerman PA, Mehlotra RK. Comparative description of haplotype structure and genetic diversity of MDR1 (ABCB1) in HIV-positive and HIV-negative populations. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(1):60-7.
- Böger CA, Gorski M, Li M, Hoffmann MM, Huang C, Yang Q, Teumer A, Krane V, O'Seaghdha CM, Kutalik Z, Wichmann HE, Haak T, Boes E, Coassin S, Coresh J, Kollerits B, Haun M, Paulweber B, Köttgen A, Li G, Shlipak MG, Powe N, Hwang SJ, Dehghan A, Rivadeneira F, Uitterlinden A, Hofman A, Beckmann JS, Krämer BK, Witteman J, Bochud M, Siscovick D, Rettig R, Kronenberg F, Wanner C, Thadhani RI, Heid IM, Fox CS, Kao WH; CKDGen Consortium. Association of eGFR-Related Loci Identified by GWAS with Incident CKD and ESRD. *PLoS Genet.* 2011; 7(9): e1002292



- Bondy CA, Lightman SL, Lightman SL. Developmental and physiological regulation of aldose reductase mRNA expression in renal medulla. *Mol Endocrinol*. 1989; 3(9): 1409-16.
- Border WA, Noble NA: Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994; 331: 1286–1292
- Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 1979; 2: 1033–16.
- Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*. 1978; 2; 1323–7.
- Capron A, Mourad M, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, Latinne D, Elens L, Haufroid V, Wallemacq P. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms influence Tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation. *Pharmacogenomics*. 2010; 11(5): 703-14.
- Carthew RW. Gene regulation by micro RNAs. *Curr Opin Genet Dev*. 2006; 16: 203-8.
- Chambers JC, Zhang W, Lord GM, van der Harst P, Lawlor DA, Sehmi JS, Gale DP, Wass MN, Ahmadi KR, Bakker SJ, Beckmann J, Bilo HJ, Bochud M, Brown MJ, Caulfield MJ, Connell JM, Cook HT, Cotlarciuc I, Davey Smith G, de Silva R, Deng G, Devuyst O, Dikkeschei LD, Dimkovic N, Dockrell M, Dominiczak A, Ebrahim S, Eggermann T, Farrall M, Ferrucci L, Floege J, Forouhi NG, ansevoort RT, Han X, Hedblad B, Homan van der Heide JJ, Hepkema BG, Hernandez-Fuentes M, Hypponen E, Johnson T, de Jong PE, Kleefstra N, Lagou V, Lapsley M, Li Y, Loos RJ, Luan J, Luttrupp K, Maréchal C, Melander O, Munroe PB, Nordfors L, Parsa A, Peltonen L, Penninx BW, Perucha E, Pouta A, Prokopenko I, Roderick PJ, Ruokonen A, Samani NJ, Sanna S, Schalling M, Schlessinger D, Schlieper G, Seelen MA, Shuldiner AR, Sjögren M, Smit JH, Snieder H, Soranzo N, Spector TD, Stenvinkel P, Sternberg MJ, Swaminathan R, Tanaka T, Ubink-Veltmaat LJ, Uda M, Vollenweider P, Wallace C, Waterworth D, Zerres K, Waeber G, Wareham NJ, Maxwell PH, McCarthy MI, Jarvelin MR, Mooser V, Abecasis GR, Lightstone L, Scott J, Navis G, Elliott P, Kooner JS. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet*. 2010; 42(5): 373-5.
- Chhabra D, Skaro AI, Leventhal JR, Dalal P, Shah G, Wang E, Gallon L. Long-Term Kidney Allograft Function and Survival in Prednisone-Free Regimens: Tacrolimus/Mycophenolate Mofetil versus Tacrolimus/Sirolimus. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Jan 26 (E pub).
- Chidlow JH Jr, Greer JJ, Anthoni C, Bernatchez P, Fernandez-Hernando C, Bruce M, Abdelbaqi M, Shukla D, Granger DN, Sessa WC, Kevil CG. Endothelial caveolin-1 regulates pathologic angiogenesis in a mouse model of colitis. *Gastroenterology*. 2009; 136(2): 575-84.
- Chidlow JH Jr, Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010; 86(2): 219-25.
- Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ, Ruiz P, Roth D, Kupin W, Rosen A, Miller J. A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate versus cyclosporine/sirolimus in renal transplantation: three-year analysis. *Transplantation*. 2006; 81(6): 845-52.

- Clipstone N, Crabtree G. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 1992; 357:695-7.
- Collins BS, Davis CL, Marsh CL, McVicar JP, Perkins JD, Alpers CE: Reversible cyclosporine arteriopathy. *Transplantation*. 1992; 54: 732–34.
- Cosio FG, Frankel WL, Pelletier RP, Pesavento TE, Henry ML, Ferguson RM. Focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts with chronic nephropathy: implications for graft survival. *Am J Kidney Dis*. 1999; 34(4): 731-8.
- Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, Thummel KE. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34(5): 836-47.
- Davis BB, Mattammal MB, Zenser TV. Renal metabolism of drugs and xenobiotics. *Nephron*. 1981; 27: 187-96.
- Deeley RG, Westlake C, Cole SC. Transmembrane transport of endo and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*. 2006; 86 : 849-99.
- Del Galdo F, Lisanti MP, Jimenez SA. Caveolin-1, transforming growth factor-beta receptor internalization, and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol*. 2008; 20: 713-9.
- Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida C, Jasmin J, Musick M, Lisanti MP, Jiménez S. Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. *Arthritis. Rheum*. 2008; 58: 2854-65.
- de Jonge H, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Reduced C0 concentrations and increased dose requirements in renal allograft recipients converted to the novel once-daily tacrolimus formulation. *Transplantation*. 2010; 90(5): 523-9.
- Del Moral R, Andujar M, Ramírez C, Gómez-Morales M, Masseroli M, Aguilar M, Olmo A, Arrebola F, Guillén M, García-Chicano MJ, Nogales FF, O'Valle F. Chronic cyclosporin A nephrotoxicity, P-glycoprotein overexpression, and relationships with intrarenal angiotensin II deposits. *Am J Pathol*. 1997; 151: 1705-14.
- Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43: 149-73.
- Dubbelboer IR, Pohanka A, Said R, Rosenberg S, Beck O. Quantification of tacrolimus and three demethylated metabolites in human whole blood using LC-ESI-MS/MS. *Ther Drug Monit*. 2012; 34:134-42
- Ekberg H, Bernasconi C, Tedesco-Silva H, Vítko S, Hugo C, Demirbas A, Acevedo RR, Grinyó J, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloz P, Halloran P. Calcineurin inhibitor minimization in the Symphony study: observational results 3 years after transplantation. *Am J Transplant*. 2009; 9(8): 1876-85.
- Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloz P, Halloran PF. ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007; 357(25): 2562-75.

- El-Dahshan K, Bakr MA, Donia AF, Badr Ael-S, Sobh MA. Ketoconazole-tacrolimus coadministration in kidney transplant recipients: two-year results of a prospective randomized study. *Am J Nephrol.* 2006; 26(3):293-8.
- Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, van Schaik RH. A New Functional CYP3A4 Intron 6 Polymorphism significantly Affects Tacrolimus Pharmacokinetics in Kidney Transplant Recipients. *Clin Chem.* 2011; 57(11):1574-83.
- Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, Mourad M, Haufroid V. Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics.* 2011; 12(10):1383-96.
- Ernst E. St John's Wort supplements endanger the success of organ transplantation. *Arch Surg.* 2002; 137(3): 316-9.
- Ezzeldin HH, Lee AM, Mattison LK, Diasio RB. Methylation of the DPYD promoter: an alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(24 Pt 1): 8699-705.
- Ferraris JR, Argibay PF, Costa L, Jimenez G, Coccia PA, Ghezzi LF, Ferraris V, Belloso WH, Redal MA, Larriba JM. Influence of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus maintenance doses and serum levels after renal transplantation: age dependency and pharmacological interaction with steroids. *Pediatr Transplant.* 2011; 15(5): 525-32.
- Filipski KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH, Sparreboom A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2009; 86(4): 396-402.
- Firdaous I, Verbeeck RK, Hassoun A, Langrehr JM, Wallemacq PE. Excretion of tacrolimus glucuronides in human bile. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1997; 22: 217-21.
- Fleming I. Cytochrome P-450 under pressure: more evidence for a link between 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and hypertension. *Circulation.* 2005; 111(1): 5-7.
- Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW, MacPhee IA.. Multidrug resistance gene-1(MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006; 82 (5): 705-8.
- Gainer JV, Lipkowitz MS, Yu C, Waterman MR, Dawson EP, Capdevila JH, Brown NJ; AASK Study Group. Association of a CYP4A11 variant and blood pressure in black men. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19(8): 1606-12.
- Galletti P, Di Gennaro CNI, Migliardi V, Indaco S, Della RF, Manna C, Chiodini P, Capasso G, Zappia V: Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 20: 1551–58.
- Gandellini P, Profumo V, Folini M, Zaffaroni N. MicroRNAs as new therapeutic targets and tools in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15(3): 265-79.
- García-Cardeña G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem.* 1996; 271(44): 27237-40.
- Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, Bowden DW, Langefeld CD, Oleksyk TK, Uscinski Knob AL, Bernhardt AJ, Hicks PJ, Nelson GW,

- Vanhollebeke B, Winkler CA, Kopp JB, Pays E, Pollak MR. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science*. 2010; 329: 841-845
- Gerloff T. Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004 ; 369 : 69-77.
  - Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR: Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*. 2001; 105: 863–875.
  - Grant DM. Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis*, 1991 ; 14 : 421-430.
  - Habano W, Gamo T, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int J Oncol*. 2009; 34(4):1 085-91.
  - Habano W, Gamo T, Terashima J, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. *BMC Cancer*. 2011; 11: 81.
  - Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Goldberg S, Schermer B, Harfe BD, McManus MT, Benzing T, Miner JH. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(11): 2150-8.
  - Haufroid V, Wallemacq P, VanKerckhove V, Elens L, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Mourad M. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant*. 2006; 6(11): 2706-13.
  - Hauser I, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, Ackermann H, Seidl C, Hocher B, Zanger UM, Geiger H, Eichelbaum M, Schwab M. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1501-11
  - Hazzan M, Hertig A, Buob D, Copin MC, Noël C, Rondeau E, Dubois-Xu YC. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(7): 1375-81.
  - Hesselink D, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, Budde K, Kuypers DR, Pisarski P, Le Meur Y, Mamelok RD, van Gelder T. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 18(4): 339-48.
  - Hocherl K, Dreher F, Vitzthum H, Kohler J, Kurtz A: Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 2427–36.
  - Hochleitner BW, Bösmüller C, Nehoda H, Frühwirt M, Simma B, Ellemunter H, Steurer W, Hochleitner EO, Königsrainer A, Margreiter R. Increased tacrolimus levels during diarrhea. *Transpl Int*. 2001; 14(4): 230-3.
  - Hoff U, Lukitsch I, Chaykovska L, Ladwig M, Arnold C, Manthathi VL, Fuller TF, Schneider W, Gollasch M, Muller DN, Flemming B, Seeliger E, Luft FC, Falck JR, Dragun D, Schunck WH. Inhibition of 20-HETE synthesis and action protects the kidney from ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2011; 79(1): 57-65.
  - Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with

P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(7): 3473-8.

- Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Bosca L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: 2315-23.
- Hu G, Ye RD, Dinauer MC, Malik AB, Minshall RD. Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294(2): 178-86.
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 773-779.
- Ingelman-Sundberg, M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369(1): 89-104.
- Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, Fujii Y, Sakuma S, Fujitsu T, Fujikawa A. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos*. 1995; 23: 28-34.
- Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, Sakuma S, Fujitsu T, Shimatani K, Sato A, Fujioka M. Isolation, identification and biological activities of oxidativemetabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 1993; 21: 971-7.
- Joy M, Nিকেleit V, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF. Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. *Pharmacotherapy*. 2005; 25 (6): 779-89.
- Juhanson P, Kepp K, Org E, Veldre G, Kelgo P, Rosenberg M, Viigimaa M, Laan M. N-acetyltransferase 8, a positional candidate for blood pressure and renal regulation: resequencing, association and in silico study. *BMC Med Genet*. 2008; 9: 25.
- Kandoussi AM, Glowacki F, Duriez P, Tacquet A, Fruchart JC, Noël C. Evolution pattern of auto-antibodies against oxidized low-density lipoproteins in renaltransplant recipients. *Nephron*. 2001; 89(3): 303-8.
- Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(9): 3432-7.
- Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S: Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2002; 62: 2257-63.
- Kim RB. Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology*. 2002; 181-182: 291-97.
- Kitamura H, Tsukamoto T. Prognostic biomarkers of renal cell carcinoma: Recent advances. *Indian J Urol* 2008; 24(1): 10-15.
- Klintmalm GB, Iwatsuki S, Starzl TE: Nephrotoxicity of cyclosporin A in liver and kidney transplant patients. *Lancet*. 1981; 1: 470-471.

- Knights KM, Miners J. Renal UDP-glucuronosyltransferases and the glucuronidation of xenobiotics and endogenous mediators. *Drug Metab Rev.* 2010; 42(1): 60-70.
- Kou R, Greif D, Michel T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporine A. *J Biol Chem.* 2002; 277: 29669–73.
- Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Jun;13(3):273-83.
- Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21(3): 438-47.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001; 27: 383-91.
- Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, Thum T. Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition Is Partly Mediated by MicroRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(2): 361-9.
- Kurose K, Sugiyama E, Saito Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: Implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* E pub 2011 Nov 29
- Kurtz A, Della BR, Kuhn K: Cyclosporine A enhances rennin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 1988; 33: 947–953.
- Kuypers D, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, Vanrenterghem Y: Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: A prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43: 741–762.
- Kuypers D, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit.* 2010; 32(4): 394-404
- Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54 (10): 1271-94.
- Lampen A, Christians U, Guengerich FP, Watkins PB, Kolars JC, Bader A, Gonschior AK, Dralle H, Hackbarth I, Sewing KF. Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. *Drug Metab Dispos.* 1995; 23: 1315–24.
- Lash LH, Zalups RK. Activities of enzymes involved in renal cellular glutathione metabolism after uninephrectomy in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 309(1):129-38.
- Lash LH. Role of renal metabolism in risk to toxic chemicals. *Env Health Persp.* 1994; 102 : 75-79.
- Lash LH, Putt DA, Cai H. Membrane transport function in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology.* 2006; 228(2-3): 200-18.

- Lash LH, Putt DA, Cai H. Drug metabolism enzyme expression and activity in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology*. 2008; 244(1): 56-65.
- Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ: An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: A report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation*. 1996; 62: 900–905.
- Lassila M: Interaction of cyclosporine A and the renin angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab*. 2002; 3: 61–71.
- Leclerc J, Courcot-Ngoubo Ngangue E, Cauffiez C, Allorge D, Pottier N, Lafitte JJ, Debaert M, Jaillard S, Broly F, Lo-Guidice JM. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie*. 2011; 93:1012-27.
- Lee E, Lee Y, Han I-O, Park S. Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF- $\beta$ 1 through down-regulating the expression of TGF- $\beta$  type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007; 359, 385-390.
- Lemahieu W, Maes B, Verbeke K, Rutgeerts P, Geboes K, Vanrenterghem Y. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea. *Am J Transplant*. 2005; 5(6):1383-91.
- Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2010; 15(6): 599-608.
- Liu Y, Wat N, Chung S, Ko B, Lam K. Diabetic nephropathy is associated with the 5'-end dinucleotide repeat polymorphism of the aldose reductase gene in Chinese subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2002; 219(2): 113-18.
- Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M. A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney Int*. 2005; 67(4): 1428-39.
- McGurk KA, Brierley CH, Burchell B. Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol*. 1998; 55(7): 1005-12.
- Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation*. 2011; 91(10):1098-102.
- Miura Y, Satoh S, Saito M, Numakura K, Inoue T, Obara T, Tsuruta H, Narita S, Horikawa Y, Tsuchiya N, Komatsuda A, Kagaya H, Miura M, Habuchi T. Factors increasing quantitative interstitial fibrosis from 0 hr to 1 year in living kidney transplant patients receiving tacrolimus. *Transplantation*. 2011; 91(1): 78-85.
- Miyata N, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res*. 2005; 41(4): 175-93.
- Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79(7): 1045-52.
- Möller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, Schäfer A, Undre NA. The disposition of <sup>14</sup>C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos*. 1999; 27: 633-66.

- Moore J, McKnight AJ, Simmonds MJ, Courtney AE, Hanvesakul R, Brand OJ, Briggs D, Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. *JAMA*. 2010; 303:1282-7
- Moriyama T, Sorokin A. Repression of BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells by pravastatin. *Transplantation*. 2008; 85(9):1311-7
- Moriyama T, Tsuruta Y, Shimizu A, Itabashi M, Takei T, Horita S, Uchida K, Nitta K. The significance of caveolae in the glomeruli in glomerular disease. *J Clin Pathol*. 2011; 64(6): 504-9.
- Morozumi K, Thiel G, Albert FW, Banfi G, Gudat F, Mihatsch MJ: Studies on morphological outcome of cyclosporine-associated arteriopathy after discontinuation of cyclosporine in renal allografts. *Clin Nephrol*. 1992; 38: 1–8.
- Morris PJ, French ME, Dunnill MS, Hunnisett AG, Ting A, Thompson JF, Wood RF: A controlled trial of cyclosporine in renal transplantation with conversion to azathioprine and prednisolone after three months. *Transplantation*. 1983; 36: 273–277.
- Moss NG, Powell SL, Falk RJ: Intravenous cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated kidneys in rats. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82: 8222–8226.
- Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*. 2011; 6(1): e16081.
- Myers B, Newton L, Boshkos C, Macoviak JA, Frist WH, Derby GC, Perloth MG, Sibley RK. Chronic injury of human renal microvessels with low-dose cyclosporine therapy. *Transplantation*. 1988; 46: 694–703.
- Myers B, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perloth M: Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med*. 1984; 311: 699–705.
- Naesens M, Kambham N, Concepcion W, Salvatierra O, Jr., Sarwal M: The evolution of non-immune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am J Transplant*. 2007; 7: 2504–14.
- Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2009a; 11: 468-80.
- Naesens M, Kuypers D, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity, *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009b; 4: 481-508.
- Nagai J, Takano M. Molecular-targeted approaches to reduce renal accumulation of nephrotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010; 6(9):1125-38
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003 ; 349: 2326–33.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation*. 2004; 78(3): 461-8.
- Nusing R, Lesch R, Ullrich V. Immunohistochemical localization of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids*, 1990 ; 3: 53-8.



- Oellerich M, Armstrong VW. The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: Recent developments. *Ther Drug Monit.* 2006 ; 28: 720– 725,
- Oestreicher K, Desmeules J, Piguet V, Dayer P. Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). *Med Hyg,* 1999; 57 : 793-800.
- Pallet N, Thervet E. The genetics of kidney transplantation. *Hum Genet.* 2011 Sep 16. E pub
- Park HC, Yasuda K, Ratliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, Yamamoto I, Jasmin JF, Bachmann S, Lisanti MP, Chander P, Goligorsky MS. Postobstructive regeneration of kidney is derailed when surge in renal stem cells during course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298(2): 357-64.
- Parkinson A. Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons. Ed Klaassen CD. McGraw Hill Companies, 1996; 113-186.
- Pelkonen O, Raunio H. Metabolic activation of toxins. Tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect,* 1997; 105 : 767-74.
- Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, Clark J, Verani RR, Chou TC, Kahan BD. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(5): 1059-71.
- Ponticelli C: De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol.* 2007; 67: 335–340.
- Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 187-197.
- Ramamoorthy A, Skaar TC. In silico identification of microRNAs predicted to regulate the drug metabolizing cytochrome P450 genes. *Drug Metab Lett.* 2011; 5(2): 126-31.
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. *Pharmacol Rev.* 2002; 54, 431-67.
- Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Aug 19;90(16):1225-9.
- Reeves-Daniel AM, DePalma JA, Bleyer AJ, Rocco MV, Murea M, Adams PL, Langefeld CD, Bowden DW, Hicks PJ, Stratta RJ, Lin JJ, Kiger DF, Gautreaux MD, Divers J, Freedman BI. The APOL1 gene and allograft survival after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2011; 11(5): 1025-30.
- Regazzi MB, Rinaldi M, Molinaro M, Pellegrini C, Calvi M, Arbustini E, Bellotti E, Bascapè V, Martinelli L, Viganò M. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 1999; 21(1): 2-7.
- Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N: The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 1459–62.
- Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human cytochrome P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002; 34: 83-448.

- Roy JN, Lajoie J, Zijenah LS, Barama A, Poirier C. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 884-887.
- Rushmore T, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* 2002; 3: 481-90.
- Sandhu S, Garzon R. Potential applications of microRNAs in cancer diagnosis, prognosis, and treatment. *Semin Oncol.* 2011; 38(6): 781-7.
- Sargiacomo M, Scherer P, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 9407-11.
- Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos.* 1992; 20: 753-61.
- Schinkel A, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 1995; 96(4): 1698-705.
- Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 285-307.
- Silva HT Jr, Yang HC, Abouljoud M, Kuo PC, Wisemandle K, Bhattacharya P, Dhadda S, Holman J, Fitzsimmons W, First MR. One-year results with extended-release tacrolimus/MMF, tacrolimus/MMF and cyclosporine/MMF in de novo kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007; 7(3): 595-608. Erratum in: *Am J Transplant.* 2007; 7(6): 1682.
- Silverman JA, Schrenk D. Hepatic canalicular membrane 4: expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J*, 1997; 11 : 308-13.
- Singh R, Manchanda PK, Kesarwani P, Srivastava A, Mittal RD. Influence of genetic polymorphisms in GSTM1, GSTM3, GSTT1 and GSTP1 on allograft outcome in renal transplant recipients. *Clin Transplant.* 2009; 23(4): 490-8.
- Sis B, Dadras F, Khoshjou F, Cockfield S, Mihatsch MJ, Solez K. Reproducibility studies on arteriolar hyaline thickening scoring in calcineurin inhibitor-treated renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 1444-50.
- Snanoudj R, Rabant M, Royal V, Pallet N, Noël LH, Legendre C. Néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine: présentation, problèmes diagnostiques et facteurs de risques. *Nephrol Ther.* 2009;5:S365-70.
- Spurdle AB, Webb P, Purdie D, Chen X, Chenevix-Trench A. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis.* 2001; 22 (1): 67-72.
- Staatz C, Goodman L, Tett S. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2010; 49(3): 141-75 and Part II. *Clin Pharmacokinet.* 2010; 49(4): 207-21
- Staatz C, Tett S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43(10): 623-53.

- Stepkowski S. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med.* 2000; 2(4):1-23.
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavaré S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science.* 2007; 315(5813): 848-53.
- Strassburg CP, Barut A, Obermayer-Straub P, Li Q, Nguyen N, Tukey RH, Manns MP. Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by a differentially expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. *J Hepatol.* 2001; 34: 865-872.
- Sweet DH. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology,* 2005; 204: 198-215.
- Tapaninen T, Neuvonen PJ, Niemi M. Grapefruit juice greatly reduces the plasma concentrations of the OATP2B1 and CYP3A4 substrate aliskiren. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 88(3):339-42.
- Tate P, Bird A. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 1993; 3: 226-31.
- Terada T, Inui K. Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 440-9.
- Textor SC, Burnett JC, Jr., Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E: Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int.* 1995; 47: 1426–1433.
- Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, Toupance O, Touchard G, Alberti C, Le Pogamp P, Moulin B, Le Meur Y, Heng AE, Subra JF, Beaune P, Legendre C. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 87(6): 721-6.
- Thier R, Golka K, Brüning T, Ko Y, Bolt HM. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts. *Toxicol Lett.* 2002; 127 : 321-7.
- Thomas C, Smart E. Caveolae structure and function. *J. Cellular. Mol. Med.* 2008; 12, 796-809.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008; 456(7224): 980-4.
- Tourkina E, Gooz P, Pannu J, Bonner M, Scholz D, Hacker S, Silver RM, Trojanowska M, Hoffman S. Opposing Effects of Protein Kinase C $\alpha$  and Protein Kinase C on Collagen Expression by Human Lung Fibroblasts Are Mediated via MEK/ERK and Caveolin-1 Signaling. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 13879-87.
- Tourkina E, Richard M, Gööz P, Bonner M, Pannu J, Harley R, Bernatchez PN, Sessa WC, Silver RM, Hoffman S. Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008; 294, 843-861.
- Trull AK. Therapeutic monitoring of tacrolimus. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 167-80.

- Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T, Yokoi T. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.* 2006; 66(18): 9090-8.
- Tzur S, Rosset S, Shemer R, Yudkovsky G, Selig S, Tarekegn A. Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. *Hum Genet.* 2010; 128: 345-50.
- Undre N. Pharmacokinetics (PK) of tacrolimus for a once daily prolonged release formulation (Advagraf) versus twice-daily (Prograf) in de novo kidney transplant recipients in a phase III multicentre study. *ICTS 2008. Transplantation* 2008; 86(2S): Abstr.527
- Undre NA, Stevenson P, Schäfer A. Pharmacokinetics of Tacrolimus : Clinical Relevant Aspects. *Transplant Proceeding.* 1999; 31 (Suppl 7A): 21S-24S.
- Utecht KN, Hiles JJ, Kolesar J. Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* 2006 ; 63: 2340-48.
- Vallés PG, Manucha W, Carrizo L, Vega Perugorria J, Seltzer A, Ruete C. Renal caveolin-1 expression in children with unilateral ureteropelvic junction obstruction. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22(2): 237-48
- Velickovic-Radovanovic R, Catic-Djordjevic A, Milovanovic JR, Djordjevic V, Paunovic G, Jankovic SM. Population pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010; 48(6): 375-82.
- Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 1995, 29 : 404-430.
- Vincenti F, Laskow DA, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ. One-year follow-up of an open-label trial of FK506 for primary kidney transplantation. A report of the U.S. Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation.* 1996; 61: 1576–1581.
- Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of Tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(4): 283-95.
- Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, Undre N, Weber LT, Westley IS, Mourad M. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009; 3: 139-152.
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* 2011; 11(4): 274-86.
- Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15(10): 693-704.
- Wang J, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Zheng H, Iacono A, McDade K, Zaldonis D, Webber S, Watanabe RM, Burckart GJ. Impact of ABCB1 (MDR1) haplotypes on tacrolimus dosing in adult lung transplant patients who are CYP3A5 \*3/\*3 non-expressors. *Transpl Immunol.* 2006a; 15(3):235-40.
- Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, Liu F, Ifedigbo E, Xu X, Oury TD, Kaminski N, Choi AM. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2006b; 203(13): 2895-2906.

- Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Guillaudeau A, Munteanu E, Essig M, Drouet M, Le Meur Y, Marquet P. Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 88(1): 95-100.
- Wolf G: Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006; 70: 1914–1919.
- Wolf SJ, Bachtiar M, Wang J, Sim TS, Chong SS, Lee CG. An update on ABCB1 pharmacogenetics: insights from a 3D model into the location and evolutionary conservation of residues corresponding to SNPs associated with drug pharmacokinetics. *Pharmacogenomics J.* 2011; 11(5): 315-25.
- Wong S. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clinica Chimica Acta.* 2001; 313:241-53.
- Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics.* 2004; 5(3): 243-72.
- Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, Wen P, Yang J. The miR-200 family regulates TGF- $\beta$ 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Feb;302(3):F369-79.
- Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005; 28 : 249-68.
- Yang S, Banerjee S, de Freitas A, Sanders YY, Ding Q, Matalon S, Thannickal VJ, Abraham E, Liu G. Participation of miR-200 in Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol.* 2012; 180(2): 484-93.
- Yokogawa K, Takahashi M, Tamai I, Konishi H, Nomura M, Moritani S, Miyamoto K, Tsuji A. P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm Res.* 1999; 16(8):1213-8.
- Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 301(4): F793-801.
- Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(3): 159-68.
- Zhdanova O, Srivastava S, Di L, Li Z, Tchelebi L, Dworkin S, Johnstone DB, Zavadil J, Chong MM, Littman DR, Holzman LB, Barisoni L, Skolnik EY. The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 2011; 80(7): 719-30.
- Zietse R, Balk AH, vd Dorpel MA, Meeter K, Bos E, Weimar W. Time course of the decline in renal function in cyclosporine-treated heart transplant recipients. *AmJ Nephrol.* 1994;14:1-5.